

**Funktionelle Charakterisierung der
 β -Adrenoceptoren kultivierter
Herzmuskelzellen**

Rainer Wittmann

1978
—



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41533917_0070

Aus dem Physiologischen Institut,
Lehrstuhl für Klinische Physiologie
(Direktor: Prof. Dr. R. Kaufmann)
der Universität Düsseldorf

FUNKTIONELLE CHARAKTERISIERUNG DER
 β -ADRENOCEPTOREN
KULTIVierter HERZMUSKELZELLEN

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n
z u r

Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch - Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Rainer Wittmann
aus Nürnberg

1977



1. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Lochner
2. Berichterstatter: Prof. Dr. J.G. Moser
3. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Peters

Tag der mündlichen Prüfung: 31.05.1978

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	Seite
0. STRUKTURFORMELN DER TESTSUBSTANZEN, ABKÜRZUNGEN DER SUBSTANZNAMEN, BEGRIFFSERKLÄRUNGEN	1
1. EINLEITUNG	4
1.1 Modellvorstellungen über Wirkungen der β-Adrenoceptorliganden und Eigenschaften des β-Adrenoceptors	4
1.2 Die kultivierte Herzmuskelzelle.- Stand der Forschung	10
1.3 Untersuchung der Eigenschaften von β- Adrenoceptoren mit Hilfe der Rezeptor- theorie	12
2. MATERIAL UND METHODE	22
2.1 Material	22
2.2 Methode	24
2.2.1 Kultivierung von Herzzellen	24
2.2.1.1 Präparation	24
2.2.1.2 Kulturbedingungen	25
2.2.2 Bestimmung des positiv chronotropen Effekts von β-Adrenoceptorliganden	27
2.2.2.1 Versuchsplatz zur Messung von Zell- kontraktionen	27
2.2.2.2 Versuchsablauf bei der Bestimmung von chronotropen Effekten an kultivierten Herzzellen	32
2.2.3 cAMP Test	33
2.2.4 Auswertung der Versuche	36
3. ERGEBNISSE	37
3.1 Morphologie der Herzzellkulturen	37
3.1.1 Rattenherzzellen	37
3.1.1.1 Stark konturierte Zellen	39
3.1.1.2 Fibroblastenartige Zellen	40
3.1.1.3 Anteil der stark konturierten und fibro- blastenartigen Zellen in einer Kultur	40
3.1.1.4 Normales physiologisches Verhalten der Rattenherzzellen, Charakteristik der Schrittmacheraktivität	41
3.1.2 Katzenherzzellen	43
3.1.3 Hühnerherzzellen	43

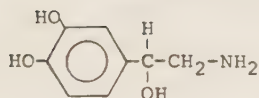
	Seite
3.2	Untersuchung des positiv chronotropen Effekts von β -Adrenoceptorliganden
	44
3.2.1.1	Positiv chronotroper Effekt von Katecholaminen an kultivierten Rattenherzzellen
	44
3.2.1.2	Positiv chronotroper Effekt von (-)-Dichloroisoproterenol an kultivierten Rattenherzzellen
	45
3.2.1.3	Positiv chronotroper Effekt von 3',4'-Dihydroxy- β -Methylpropiofenon an kultivierten Rattenherzzellen
	48
3.2.2.1	Antagonismus der positiv chronotropen Effekte von β -Adrenoceptorliganden mit (-)-Bupranolol
	49
3.2.2.2	Positiv chronotroper Effekt von (-)-Isoproterenol an kultivierten Katzenherzzellen, Hemmung durch (-)-Bupranolol
	52
3.2.2.3	Unempfindlichkeit von kultivierten Hühnerherzzellen auf Zugabe von (-)-Isoproterenol
	52
3.2.3	Antagonismus zwischen (-)-DCI und (-)-Isoproterenol: Berechnung der fraktionellen Rezeptorbesetzungskurve und der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten für den (-)-DCI-Rezeptorkomplex
	54
3.3	Untersuchung des Effekts von β -Adrenoceptorliganden auf den zellulären cAMP Gehalt
	56
3.3.1	Einfluß der Kulturbedingungen auf den cAMP Gehalt der kultivierten Ratten- und Hühnerherzzellen
	56
3.3.2	Effekt von (-)-Isoproterenol auf den cAMP Gehalt kultivierter Rattenherzzellen
	59
3.3.2.1	Kinetik der Katecholaminwirkung
	59
3.3.2.2	Dosis-Wirkungskurven der durch (-)-Isoproterenol induzierten Änderung des cAMP Gehalts kultivierter Rattenherzzellen
	61
3.3.2.3	Hemmung des den cAMP Gehalt kultivierter Rattenherzzellen beeinflussenden Effekts von (-)-Isoproterenol durch (-)-Bupranolol
	63
3.3.3.1	Effekt von (-)-Dichloroisoproterenol auf den cAMP Gehalt von Rattenherzzellkulturen
	64
3.3.3.2	Dosis-Wirkungskurve
	66
3.3.3.3	Hemmung des Effekts durch (-)-Bupranolol
	67
3.3.4	Effekt von 3',4'-Dihydroxy- β -Methylpropiofenon auf den zellulären cAMP Gehalt kultivierter Rattenherzzellen
	68
3.3.5	Effekt von (-)-Isoproterenol auf den cAMP Gehalt von Zellkulturen embryonaler Hühnerherzen
	70

	Seite
4.	DISKUSSION
	Übersicht über den Umfang der erhaltenen Ergebnisse und kurze Darstellung der Diskussionspunkte
	72
5.	ZUSAMMENFASSUNG
	106
6.	LITERATURVERZEICHNIS
	108
7.	TABELLEN
	122
8.	ABBILDUNGEN
	128

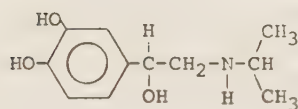
O. S T R U K T U R F O R M E L N D E R T E S T S U B S T A N Z E N
=====

A B K Ü R Z U N G E N D E R S U B S T A N Z N A M E N
=====

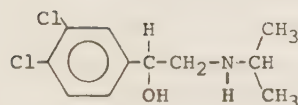
B E G R I F F S E R K L Ä R U N G E N
=====



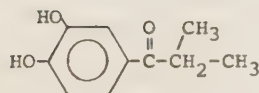
(-)-Noradrenalin (NA)



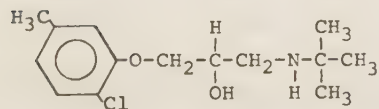
(-)-Isopropylnoradrenalin
= Isoproterenol (ISO)



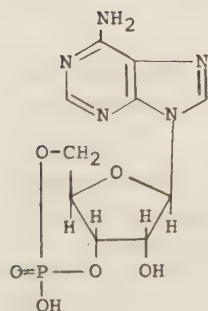
(-)-Dichloroisopropyl-
noradrenalin (DCI)



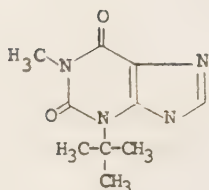
3',4'-Dihydroxy-β-Methyl-
propiophenon (U-0521)



(-)-Bupranolol (KL 255) (BU)



Adenosin-3',5'-Monophosphat
= Cyclisches AMP (cAMP)



3-Isobutyl-1-Methylxanthin
(MIX)

Adenylyl-Cyclase: Nach dem Nomenklaturvorschlag von BIRNBAUMER (1973): Enzym, das die Reaktion $ATP \longrightarrow cAMP$ katalysiert.

Andere Trivialnamen: Adenyl-Cyclase, Adenylat-Cyclase (E.C. 4.6.1.1)

β -Adrenoceptor: Nach der Klassifizierung von AHLQUIST (1948), gebräuchlich auch β -Rezeptor.

Rezeptor: In dieser Arbeit wird der Begriff Rezeptor im Sinne von BIRNBAUMER und Mitarbeitern (1974) gebraucht, der im Gegensatz zu anderen Autoren einen Unterschied zwischen Rezeptoren und Akzeptoren macht.

Intrinsic activity (α): Substanz-abhängige Größe, die darüber Auskunft gibt, wie groß der durch sie maximal induzierte Effekt im Vergleich zu dem maximalen Effekt eines vollen Agonisten ist.

$$\alpha = \frac{\text{Maximaleffekt eines partiellen Agonisten}}{\text{Maximaleffekt eines vollen Agonisten}}$$

Voller Agonist: $\alpha = 1$ Induziert Effekte, die durch Rezeptoren vermittelt werden.

Partieller Agonist: $1 > \alpha > 0$ Induziert Effekte, die geringer sind als die Effekte, die durch den vollen Agonisten ausgelöst werden.

Antagonist: $\alpha = 0$ Hemmt die durch Agonisten induzierten Effekte, indem er Rezeptoren besetzt, ohne dabei selbst Effekte auszulösen.

Zeichenerklärung:

[A]	Konzentration des Agonisten
[B]	Konzentration eines anderen Liganden (z.B. eines Hemmers)
[P]	Konzentration eines Partiellen Agonisten
[R]	Konzentration der Rezeptoren
[AR], [BR], [PR]	Konzentration des Liganden-Rezeptor-komplexes
[R] _t	Konzentration der Gesamtzahl der vorhandenen Rezeptoren
W	Wirkung
S	Stimulus = $e \cdot y$
y_A	fraktionelle Rezeptorbesetzung der Rezeptoren durch den Liganden A
y_P	fraktionelle Rezeptorbesetzung der Rezeptoren durch den Liganden P
K_A, K_B, K_P	Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten der entsprechenden Substanzen mit dem Rezeptor
k_1	Geschwindigkeitskonstante der Bildung des Rezeptor-Agonistenkomplexes
k_2	Geschwindigkeitskonstante des Zerfalls des Agonisten-Rezeptorkomplexes
f	Proportionalitätskonstante
e_A, e_P	Wirksamkeit (efficacy); drogenabhängige Konstante

1. E I N L E I T U N G =====

1.1 MODELLVORSTELLUNGEN ÜBER WIRKUNGEN DER β -ADRENOCEPTOR-LIGANDEN UND EIGENSCHAFTEN DES β -ADRENOCEPTORS

Die kontraktile Aktivität einer Herzmuskelzelle kann durch die Kraft der Kontraktion (Inotropie), die Frequenz der Schlagaktivität (Chronotropie) und die Geschwindigkeit, mit welcher die Herzmuskelzelle erschlafft (Bathmotropie) beschrieben werden. Alle diese Größen werden durch Katecholamine positiv beeinflusst.

Katecholamine können an der Plasmamembran der Herzzelle unspezifisch gebunden werden. Für die Hormonwirkung entscheidend ist jedoch die Bindung an spezifische β -Adrenoceptoren (BIRNBAUMER und Mitarbeiter, 1974).

Im lebenden Organismus werden Katecholamine auf zwei Wegen an die Herzmuskelzelle herangebracht: über die Blutbahn, als Hormon der Nebenniere (Adrenalin) und direkt, als Sekret der Endigungen adrenerger Nerven (Noradrenalin). Die Wirkung dieser Hormone ist von ihrer Konzentration abhängig.

Intrazellulär durch Iontophorese applizierte Katecholamine zeigen keine der genannten Effekte, so daß anzunehmen ist, daß der β -Adrenoceptor an der Außenseite der Zellmembran lokalisiert ist (REUTER, 1974). Die β -Adrenoceptoren sind in noch unbekannter Weise mit der Adenyl-Cyclase, die an der Innenseite der Zellmembran lokalisiert ist, gekoppelt. Dieses Enzym wandelt Adenosintriphosphat (ATP) in cyclisches Adenosin-3',5'-Monophosphat (cyclisches AMP, c-AMP) um (SUTHERLAND und Mitarbeiter, 1962; DAVOREN und SUTHERLAND, 1963; ØYE und SUTHERLAND, 1966). Folgendes von SUTHERLAND und Mitarbeitern (1968) erstmals postulierte Modell wird für die Wirkungsweise der Katecholamine angenommen:

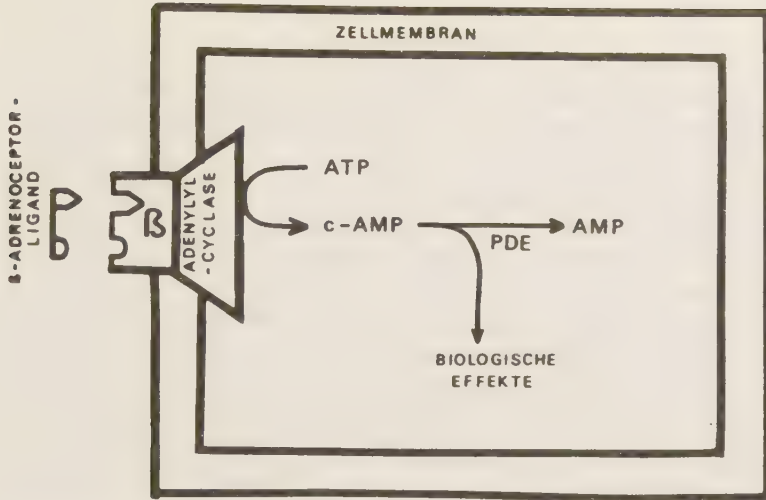


Abb. 1a, Modell I

Die Adenylat-Cyclase ist an den β -Adrenoceptor gekoppelt. Das produzierte c-AMP dient als intrazellulärer Übermittler ("second messenger") hormoninduzierter Wirkungen (ROBINSON und Mitarbeiter, 1971). Das Enzym Phosphodiesterase (PDE), welches c-AMP zu AMP spaltet, reguliert die zelluläre c-AMP Konzentration (ROBINSON und Mitarbeiter, 1965).

Die primären Wirkungen des c-AMP, die durch SUTHERLAND und RALL (1960) beschrieben wurden, liegen in der Aktivierung von Proteinkinasen, welche energiereiches Phosphat auf Akzeptorproteine übertragen. Die phosphorylierten Akzeptorproteine sind in der Lage, Konformationsänderungen von Enzymen der Glykolyse, der Glykogenolyse und der Fettsäuremobilisation zu katalysieren. Auf ähnliche Weise beeinflusst c-AMP ionentransportierende ATP-asen, z.B. erhöht es die Wechselzahl des Calcium-Aufnahmemechanismus in das sarkoplasmatische Retikulum (TADA und Mitarbeiter, 1974a,b).

Einflüsse von c-AMP auf die Permeabilität der Ionenkanäle der Plasmamembran von Herzmuskelzellen sind bekannt (REUTER, 1974; TSIEN und Mitarbeiter, 1972; TSIEN, 1973; YAMASAKI

und Mitarbeiter, 1973), jedoch ist hier der Wirkungsmechanismus des cyclischen Nukleotids noch weitgehend ungeklärt.

Da es möglich ist, durch in die Zelle injiziertes c-AMP (TSIEN, 1973; YAMASAKI und Mitarbeiter, 1973) oder durch das zellwandpermeable N^6 -2-O-Dibutyryl-3',5'-cAMP (KUKOVETZ und Mitarbeiter, 1975; SKELTON und Mitarbeiter, 1970; KAUMANN, 1977; KRAUSE und Mitarbeiter, 1970; MEINERTZ und Mitarbeiter, 1976; REUTER, 1974; TSIEN und Mitarbeiter, 1972) die für einen Katecholstimulus typischen Effekte an der Herzmuskelzelle auszulösen, wird auch für die Wirkungsweise der Katecholamine an der Herzzelle das oben beschriebene Modell angenommen.

Jedoch existieren Befunde, die dem skizzierten Modell widersprechen. Die Unklarheiten darüber, ob c-AMP generell auch als "second messenger" für die durch β -Adrenoceptoren übermittelten Effekte der Katecholamine auf das Herz fungiert, sind in einem Übersichtsartikel von SOBEL und MAYER (1973) dargelegt. Einige Beispiele dafür sollen kurz erwähnt werden.

Da die Zellwand für c-AMP undurchlässig ist, kann man, wie bereits erwähnt, die von dem cyclischen Nukleotid induzierten Effekte dadurch untersuchen, daß man die Substanz mittels intrazellulärer Iontophorese durch eine Mikrokapillare injiziert. In Versuchen an Herz-Purkinjefasern (TSIEN, 1973) und Sino-Atrialknoten (YAMASAKI und Mitarbeiter, 1973) verursachte c-AMP, das auf diese Weise verabreicht wurde, ähnliche Effekte, wie sie durch extrazelluläre Applikation von Katecholaminen erhalten wurden. Merkwürdigerweise gelingt es jedoch nicht, gleiche Wirkungen durch Katecholaminzugabe und durch c-AMP zu erreichen, wenn die Zellmembran mit 3% Dimethylsulfoxid für das cyclische Nukleotid permeabel gemacht wurde (KJEKSHUS und SOBEL, 1970; KJEKSHUS und Mitarbeiter, 1971).

Hemmt man das c-AMP abbauende Enzym Phosphodiesterase, z.B. mit Methylxanthinen, erhöht sich der intrazelluläre c-AMP-Spiegel. Deshalb versucht man anhand von Ergebnissen, die in Versuchen mit Methylxanthinen gewonnen wurden, Rückschlüsse auf die Wirkungsweise von c-AMP zu ziehen (TSIEN, 1974b).

Allerdings konnten BLINKS und Mitarbeiter (1972) zeigen, daß die gebräuchlichen Phosphodiesterasehemmer schon in wesentlich niederen Konzentrationen, als zur Hemmung der Phosphodiesterase notwendig sind, positiv inotrope Effekte hervorrufen. Auf Grund dieser Befunde ergibt sich die Frage, ob c-AMP tatsächlich jener "second messenger" bei der Übermittlung der von Katecholaminen induzierten Effekte an der Herzmuskelzelle ist.

Weiterführende Aufschlüsse über den Mechanismus β -adrenoceptorvermittelter Hormonwirkungen an der Herzmuskelzelle könnte ein Vergleich der Konzentrationsabhängigkeiten der von Katecholaminen induzierten mechanischen und positiv chronotropen Effekte mit ihrer Adenylyl-Cyclase stimulierenden Wirkung ergeben.

Die Adenylyl-Cyclase stimulierende Wirkung von (-)-Isoprote-renol wurde von KAUMANN und BIRNBAUMER (1974, 1976) an isolierten Herz-Membranpartikeln untersucht. Durch diese Untersuchungen konnte bewiesen werden, daß die β -Adrenoceptoren, die die Adenylyl-Cyclase stimulieren, die gleichen Affinitätseigenschaften gegenüber β -Adrenoceptorblockern aufweisen, wie sie für die Rezeptoren, die die positiv chronotropen und herzmekanischen Effekte von (-)-Isoproterenol übermitteln, schon bekannt waren. Andererseits sind aber höhere Konzentrationen der spezifischen β -Adrenoceptorliganden notwendig, um die Adenylyl-Cyclase der isolierten Herzmembranpartikel zu aktivieren, als für die Induktion von chronotropen und

inotropen Effekten an Herzpräparaten nötig sind. Mit Hilfe von Guanyl-Nukleotiden kann zwar die Koppelung zwischen β -Adrenoceptor und Adenyl-Cyclase an den isolierten Membranpartikeln verbessert werden (KAUMANN und Mitarbeiter, 1976); dennoch bleiben isolierte Membranpartikel ein für das biologische Reaktionsmodell zunächst nur wenig aussagekräftiges System.

An Herzpräparaten wurde ebenfalls versucht, eine Korrelation zwischen der durch Katecholamine induzierten Zunahme der Adenyl-Cyclase-Aktivität und der herzmechanischen Aktivierung herzustellen. Dabei wurde von BENFEY (1971) und von SHANFELD und Mitarbeitern (1969) keine Übereinstimmung der beiden Wirkungen gefunden. Dagegen berichten JUNGBLUTH und Mitarbeiter (1976) von einer Korrelation des durch (-)-Isoproterenol induzierten positiv inotropen Effekts und der durch gleiche Konzentrationen des Hormons bedingten Änderung des c-AMP Gehalts von Herzgeweben.

Diese Befunde über die Wirkung der Katecholamine auf die Herzmuskelzelle wurden an Präparaten gewonnen, die vom Kreislaufsystem abgetrennt waren, und günstigstenfalls auf Grund ihrer geringen Dimensionen geeignete Diffusionsverhältnisse für die applizierten Katecholamine erwarten ließen. Die Effekte der Katecholamine auf die Kontraktionsfrequenz sowie auf den Kontraktionsverlauf einzelner Zellen setzen schon nach sehr kurzer Zeit ein. Im Herzpräparat wäre demnach die Kinetik der von Katecholaminen induzierten Wirkungen durch die Diffusionskinetik solcher Substanzen überlagert.

Zusammengefaßt ergeben sich außerdem für ein System, an dem man direkt und möglichst unbeeinflusst von Fremdwirkungen den Einfluß von Katecholaminen auf die Aktivität der Herzmuskelzelle untersuchen kann, folgende Forderungen:

- 1) Zur Charakterisierung des β -Adrenoceptors müssen konzentrationsbeeinflussende Diffusionsbarrieren weitgehend ausgeschaltet werden; nur so ist die Kinetik der Besetzung des β -Adrenoceptors durch Katecholamine bestimmbar.
- 2) Wegen der großen Diffusionsstrecken im Herzpräparat wirkt sich an einigen Spezies die extraneuronale Aufnahme von Katecholaminen auf die Bestimmung von Dosis-Wirkungskurven aus (KAUMANN, 1970, 1972; CALLINGHAM und BURGEN, 1966). In einem idealen Versuchssystem sollte der Einfluß der extraneuronalen Aufnahme die Resultate nicht beeinflussen.
- 3) Die Konzentration der Katecholamine an der Plasmamembran darf weder durch Neurosekretion adrenerger Nerven, noch durch neuronale Aufnahme beeinflußt werden. In Herzpräparaten werden quantitative Studien über die Wirkungsweise von Katecholaminen a) durch Freisetzung der Hormone aus Nervenendigungen (z.B. durch Methylxanthine, WESTFALL, 1968; oder (-)-DCI, DHALLA, 1967; VOGIN und DHALLA, 1967), sowie b) durch neuronale Aufnahme (FURCHGOTT und Mitarbeiter, 1964; IVERSEN, 1967) beeinflußt.
- 4) Unspezifische Absorption von Katecholaminen in Bindegewebs- und Fettzellen bewirken, daß im Herzpräparat die Konzentration des Liganden in der Biophase (FURCHGOTT, 1955) des β -Adrenoceptors kleiner ist als die Konzentration im umgebenden Medium (KAUMANN, 1970, 1972). Ein Fremdzellanteil sollte demnach bei Untersuchungen an Herzmuskelzellen möglichst gering gehalten werden.
- 5) Das System muß die Möglichkeit bieten, das mechanische und zeitabhängige Verhalten der Kontraktionen der Herzmuskelzelle nach Zugabe von Katecholaminen zu messen und es in Korrelation mit der Produktion von c-AMP, möglicherweise auch in Korrelation zu der subzellulären Kompartimentierung dieser Substanz zu setzen.

- 6) Das System ist daraufhin zu überprüfen, ob seine Empfindlichkeit gegenüber Katecholaminen den bisher an intakten Geweben gefundenen Dosis-Abhängigkeiten der durch die Hormone induzierten Wirkungen entspricht.

Die zuvor genannten Forderungen an ein Versuchssystem zur Untersuchung von Reaktionen, die durch den β -Adrenoceptor vermittelt werden, sind weitgehend von der kultivierten, isolierten Herzmuskelzelle erfüllt. In Herz-Zellkulturen entfallen lange Diffusionsstrecken zwischen Medium und Biophase, der Fremdzellanteil ist verhältnismäßig gering, vor allem sind keine Nervenzellen vorhanden. Zellkontraktionen von Einzelzellen können gemessen werden. Ebenso kann der c-AMP-Gehalt der Zellen bestimmt werden. Eine Untersuchung der subzellulären Kompartimentierung des c-AMP ist jedoch bisher noch technisch ungelöst.

1.2 DIE KULTIVIERTE HERZMUSKELZELLE. STAND DER FORSCHUNG

Nachdem HARRISON (1908) eine Technik erarbeitet hatte, mit der man Nervengewebe unter künstlichen Bedingungen am Leben erhalten konnte, gelang es BURROWS (1912), Herzzellen zu kultivieren. Er explantierte Hühnchenherzen und konnte ein Auswachsen von Zellen beobachten, die - unabhängig voneinander - rhythmisch schlugen. Damit konnte er einen der heute gültigen Beweise für die Theorie der myogeninduzierten Herzerregung erbringen.

Die Technik, Gewebe mit Hilfe proteolytischer Enzyme in ihre Zellbestandteile zu dissoziieren, wurde 1952 von MOSCONA als Routinemethode eingeführt, um reproduzierbare Zellkulturen zu erhalten. Daraufhin gelang es CAVANAUGH (1955), embryonale Hühnerherzen nach Disaggregation mit Trypsin in Kultur zu bringen. Die gleiche Methode konnte auch an Herzen neugeborener Ratten angewandt werden (HARARY und FARLEY, 1960). Seitdem wurden intensive Studien an kultivierten Herzzellen betrieben.

Die Vielzahl der Untersuchungen führte zu einer Standardisierung der Kultivations technik (HALLE, 1963; DE HAAN, 1967a; HALLE und WOLLENBERGER, 1971).

Einerseits interessiert die Entwicklung und Differenzierung der Einzelzellen in Kultur, das heißt das Auftreten von Zellen unterschiedlicher Morphologie (MARK und STRASSER, 1966), die Ausbildung von Myofibrillen (RUMERY und Mitarbeiter, 1961, 1964), sowie das Wachstum der gesamten Zellpopulation (RINALDINI, 1954; GORDON und WILDE, 1965).

Andererseits stehen im Vordergrund der Untersuchungen die Probleme, die mit der Kontraktilität der Herzzelle verbunden sind. Es werden Einflüsse der Kultivationsbedingungen auf den prozentualen Anteil von spontan schlagenden Zellen in einer Kultur (MARK und Mitarbeiter, 1967; DE HAAN, 1967a,b; WOLLENBERGER, 1964) und auf die Stabilität der Spontanfrequenz (GOSHIMA, 1973) untersucht. Bilden zwei benachbarte Zellen im Verlauf der Kultivierung Kontakte aus, so beeinflussen sich die Zellen gegenseitig und schlagen synchron (GAROFOLINI, 1927; DE HAAN und HIRAKOW, 1970; GOSHIMA und TONOMURA, 1969). Die Synchronisation kann über nicht schlagende Zellen weitergeleitet werden (GOSHIMA, 1970) und führt beim Ausbilden eines Monolayers zu synchron schlagenden Zellrasen (DE HAAN und SACHS, 1972). Die Schrittmacherefunktion von einzelnen Herzzellen ist demnach bei kultivierten Herzzellen gewährleistet.

Versuche über das elektrische Verhalten von kultivierten Hühnerherzzellen zeigten, daß in der Zellkultur mindestens drei verschiedene pulsierende Zelltypen unterschieden werden können, nämlich Zellen mit Ventrikel-, Vorhof- und Schrittmachercharakteristik (KAUFMANN und Mitarbeiter, 1969). Intensive Studien über das elektrische Verhalten der kultivierten Zellen ergaben eine Übereinstimmung von elektrophysiologischen Eigenschaften der kultivierten Herzzellen mit denjenigen von intakten Herzen (LEHMKUHL und SPERELAKIS, 1963, 1967; SPERELAKIS und LEHMKUHL, 1964; SPERELAKIS, 1972; KAUFMANN und Mitarbeiter, 1969). Im Unterschied zum intakten Herzen beeinflußt jedoch TTX (Tetrodotoxin) das kontraktile Verhalten von kultivierten Hühnerherzzellen (SHIGENOBU und SPERELAKIS, 1971) und Rattenherzzellen (SCHWAMBORN und Mitarbeiter, 1976) nicht.

Da aus den beschriebenen Versuchen sehr viele Informationen über das Versuchssystem - kultivierte Herzzelle - vorliegen, und da die Zellkultur ferner Vorteile gegenüber dem Herzpräparat bietet, untersuchten schon andere Autoren positiv chronotrope Effekte von Katecholaminen an kultivierten Zellen (WOLLENBERGER, 1964; HARRISON und Mitarbeiter, 1966; KRAUSE und Mitarbeiter, 1970; BODER und JOHNSON, 1972; CHANG und CUMMING, 1972; GOSHIMA, 1974; ERTEL und Mitarbeiter, 1971). Jedoch fanden zwei Arbeitsgruppen an kultivierten Hühnerherzzellen keine Wirkung von Katecholaminen (SPERELAKIS, 1972; KAUFMANN und Mitarbeiter, 1969).

Ein Einfluß von Katecholaminen auf den c-AMP-Gehalt kultivierter Rattenherzzellen wurde von MOURA und SIMPKINS (1975) ebenfalls untersucht. Da diese Autoren jedoch an den gleichen Zellen keine Studien über den chronotropen Effekt der untersuchten Substanzen durchgeführt haben, und die Dosis-Abhängigkeit nur bei vier Konzentrationen untersucht wird, ist hier kein eindeutiger Vergleich mit der chronotropen Wirkung der Substanzen möglich.

1.3 UNTERSUCHUNG DER EIGENSCHAFTEN VON β -ADRENOCEPTOREN MIT HILFE DER REZEPTORTHEORIE

Eine genaue Aussage über den Mechanismus der Reaktionen, die Katecholamine durch ihre Wechselwirkung mit den β -Adrenoceptoren induzieren, kann nur dann erhalten werden, wenn man die Rezeptorbesetzung der Herz- β -Adrenoceptoren mit der damit verbundenen Änderung des c-AMP Gehalts der Zellen, sowie mit der dadurch induzierten positiv chronotropen Aktivität vergleicht.

Inwieweit das mit Hilfe der konventionellen Rezeptortheorie anhand funktioneller Daten möglich ist, soll im Folgenden erläutert werden:

Die Konzentration des Rezeptor-Agonisten-Komplexes ($[AR]$) wird von zwei Reaktionen bestimmt



Nach HILL (1909) gilt für die Bildungsgeschwindigkeit des Agonisten-Rezeptorkomplexes

$$\frac{d AR}{dt} = k_1[A] \cdot [R] - k_2[AR] \quad (3)$$

Im Gleichgewichtszustand ist die Bildungsgeschwindigkeit des Rezeptor-Agonistenkomplexes v_1 gleich der Zerfallsge-

schwindigkeit v_2 , also

$$\frac{d \text{AR}}{dt} = 0 \quad (4)$$

Setzt man in Gleichung (3) für $[\text{R}]$ die Konzentration der nicht besetzten Rezeptoren, nämlich $[\text{R}]_t - [\text{AR}]$ gilt im Gleichgewichtszustand

$$\frac{[\text{A}][\text{R}]_t - [\text{AR}]}{[\text{AR}]} = \frac{K_2}{K_1} = K_A \quad (5)$$

wobei K_A die Gleichgewichtsdissoziationskonstante der Reaktion ist.

Die absolute Konzentration der Rezeptoren $[\text{R}]_t$ im Gewebe ist nicht bekannt. Es ist deshalb nicht möglich mit Hilfe der Gleichung (5) die Konzentration der von einem Agonisten besetzten Rezeptoren direkt zu bestimmen. Jedoch läßt sich die anteilige Rezeptorbesetzung

$$y_A = [\text{AR}]/[\text{R}]_t \quad (6)$$

bestimmen. Durch Umformen der Gleichung (5) ergibt sich für die anteilige Rezeptorbesetzung folgende Abhängigkeit:

$$y_A = \frac{[\text{A}]}{[\text{A}] + K_A} = \frac{1}{1 + K_A/[\text{A}]} \quad (7)$$

Anhand der Gleichung (7) könnte aus funktionellen Daten nur dann eine Aussage über die anteilige Besetzung der β -Adrenoceptoren durch Agonisten (y_A) gemacht werden, wenn das durch $[\text{A}]$ induzierte Wirkungsausmaß der Rezeptorbesetzung $[\text{AR}]$ direkt proportional wäre.

Da in unserem Fall die Zwischenschritte bei der Übermittlung der Effekte nicht bekannt sind, muß die Rezeptorbesetzungskurve nicht unbedingt mit der Dosis-Wirkungskurve der Effekte übereinstimmen. Eine halbmaximale Wirkung muß somit

nicht zwingenderweise auf halbmaximale Rezeptorbesetzung zurückzuführen sein, sondern es könnten schon maximale Wirkungen bei geringer Rezeptorbesetzung auftreten.

Wir könnten also mit den Meßparametern unserer Versuche (Änderung der Chronotropie, Änderung des c-AMP Inhalts der Zellen) die anteilige Rezeptorbesetzung nicht bestimmen.

Ein kompetitiver Antagonist kann als Ligand betrachtet werden, dessen einziger "Effekt" eine Rezeptorbesetzung ist. In Gegenwart eines Antagonisten ist ein Agonist weniger wirksam, da er weniger Rezeptoren besetzen kann. GADDUM (1955) fand, daß der Konzentrationsquotient zwischen gleich-effektiven Konzentrationen des Agonisten, die in Gegenwart und Abwesenheit eines kompetitiven Antagonisten bestimmt wurden, als Maß für den Effekt des Antagonisten dienen kann. In der folgenden Abbildung ist die Hemmung des Effekts eines Agonisten durch einen kompetitiven Antagonisten dargestellt. Die Dosis-Wirkungskurve des Agonisten ist in Gegenwart des kompetitiven Antagonisten zu höheren Konzentrationen verschoben und verläuft parallel der Dosis-Wirkungskurve, die in Abwesenheit des Antagonisten bestimmt wurde.

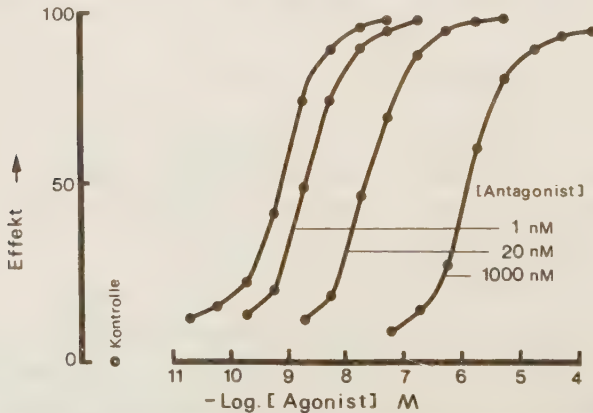


Abb. 2: Dosis-Wirkungskurven eines Agonisten in Abwesenheit sowie in Gegenwart drei verschiedener Konzentrationen eines kompetitiven Antagonisten.

In Gegenwart eines kompetitiven Antagonisten B ändert sich Gleichung (7), und es gilt für die anteilige Rezeptorbesetzung (GADDUM und Mitarbeiter, 1955)

$$y_A = \frac{[A]_B}{[A]_B + K_A(1 + [B]/K_B)} \quad (8)$$

In der Annahme, daß gleiche Wirkungen durch gleiche Rezeptorbesetzungen induziert werden, können Gleichung (7) und (8) gleichgesetzt und umgeformt werden.

$$\frac{[A]}{[A] + K_A} = \frac{[A]_B}{[A]_B + K_A(1 + [B]/K_B)} \quad (9)$$

$$\frac{[A]_B}{[A]} = 1 + [B]/K_B \quad (10)$$

$[A]_B/[A]$ ist der Konzentrationsquotient (KQ), der zwischen gleichwirksamen Konzentrationen des Agonisten, die in Gegenwart und in Abwesenheit des Hemmers $[B]$ bestimmt wurden, berechnet wurde. Mit Hilfe der Gleichung (10) kann man demnach aus einem Versuch, wie er in der obigen Abbildung dargestellt ist, die Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_B zwischen kompetitiven Antagonisten und β -Adrenoceptor bestimmen.

Nach ARUNLAKSHANA und SCHILD (1959) kann Gleichung (10) wie folgt umgeformt werden:

$$\log ([A]_B/[A] - 1) = \log [B] - \log K_B \quad (11)$$

Trägt man $\log (KQ - 1)$ gegen $\log [B]$ in einem Koordinatensystem auf, so erhält man im einfach kompetitiven Fall eine Gerade mit der Steigung 1, deren Schnittpunkt mit der $\log [B]$ -Achse gleich K_B ist. In der folgenden Abbildung sind die Konzentrationsquotienten, die in dem oben abgebildeten Versuch ermittelt wurden, in der doppeltlogarithmischen Darstellungsweise gegen die entsprechenden Hemmerkonzentrationen aufgetragen.

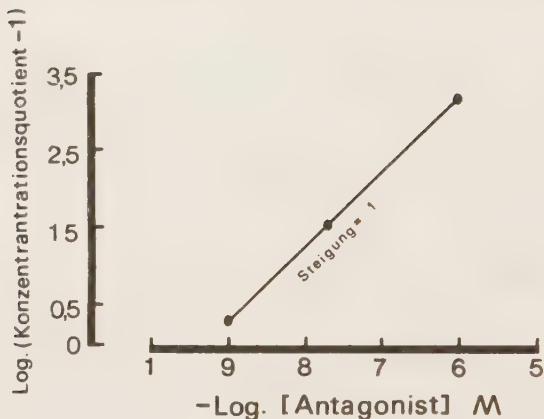


Abb. 3: Hemmung des Effekts eines Agonisten durch einen kompetitiven Antagonisten (doppelt-logarithmische Darstellungsweise).

Partielle Agonisten induzieren im Gegensatz zu Antagonisten eine stimulierende Wirkung. Da sie viele Rezeptoren besetzen, um diese Wirkung hervorzurufen, hemmen sie gleichzeitig die Wirkungen, die durch volle Agonisten induziert werden. Dieses Verhalten der partiellen Agonisten macht man sich zunutze, um die fraktionelle Rezeptorbesetzungskurve der β -Adrenoceptoren durch partielle Agonisten und deren Gleichgewichtsdissoziationskonstante mit dem Rezeptor zu ermitteln. Das Bestimmungsverfahren ist in der folgenden Abbildung dargestellt und anschließend erläutert.

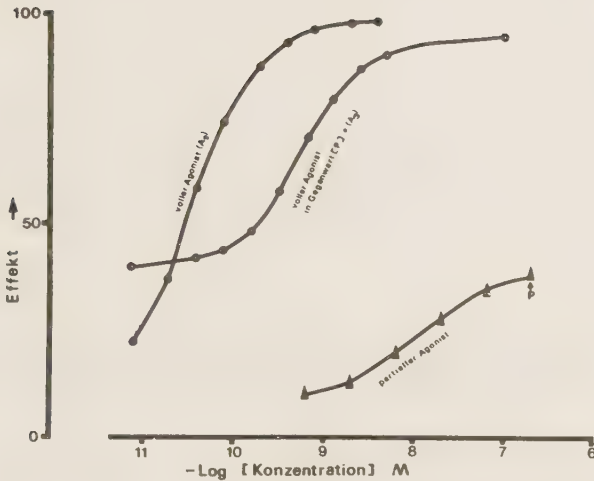


Abb. 4: Hemmung des Effekts eines Agonisten durch einen partiellen Agonisten.

Zuerst wird eine kumulative Dosis-Wirkungskurve des von dem vollen Agonisten induzierten Effekts ermittelt ($\bullet$). Anschließend wird die Substanz ausgewaschen. Danach bestimmt man die Konzentrationsabhängigkeit des von dem partiellen Agonisten stimulierten Effekts (Δ). In Gegenwart der maximaleffektiven Konzentration des partiellen Agonisten wird nun eine zweite Dosis-Wirkungskurve des Effekts des vollen Agonisten aufgenommen ($\circ$).

STEPHENSON (1956) geht in seiner Theorie über die Wirkungsweise von partiellen Agonisten von folgenden Überlegungen aus: Volle Agonisten verursachen maximale Wirkungen, indem sie nur wenige Rezeptoren besetzen. Diese Annahme ist für Acetylcholinrezeptoren bewiesen (FURCHGOTT und BURSZTYN, 1968) und kann für β -Adrenoceptoren angenommen werden (KAUMANN und Mitarbeiter, 1977b). Deshalb kann man keine einfache Abhängigkeit der Wirkung (W), die durch einen Agonisten induziert wird, von der fraktionellen Rezeptorbesetzung (y_A) annehmen, wie sie z.B. durch folgende Gleichung gekennzeichnet wird:

$$W = f \cdot y_A \quad (12)$$

Vielmehr muß man zusätzlich eine weitere drogenabhängige Konstante e_A = die Wirksamkeit (efficacy) einer Substanz einführen:

$$W = f \cdot e_A \cdot y_A \quad (13)$$

Das Produkt $e_A \cdot y_A$ bezeichnet STEPHENSON als Stimulus (S).

$$W = f \cdot S \quad (14)$$

Dabei nimmt er an, daß die Stimuli, die benötigt werden, um Wirkungen zu verursachen, additiv sind. Bezogen auf die obige Zeichnung würde das bedeuten: Die Konzentration $[A]_2$ des Agonisten bedingt einen Stimulus S_2 , der wiederum eine Wirkung W induziert. Die gleiche Wirkung kann aber auch bei gleichzeitiger Zugabe des partiellen Agonisten [P] und der Konzentration $[A]_3$ des Agonisten erhalten werden. Dabei induziert [P] den Stimulus S_1 und $[A]_3$ den Stimulus S_3 .

Es gilt demnach bei gleicher Wirkung

$$S_2 = S_1 + S_3 \quad (15)$$

Für den Stimulus S_1 stehen dem partiellen Agonisten fast alle Rezeptoren zur Verfügung, da $[A]_3$ nur wenige Rezeptoren besetzt, um eine Wirkung zu induzieren.

$$S_1 = e_P \cdot y_P \quad (16)$$

Demgegenüber stehen viel weniger Rezeptoren zur Verfügung, um den Stimulus S_2 zu setzen. Der partielle Agonist hat nämlich bereits sehr viele der Gesamtzahl der Rezeptoren besetzt, sodaß in diesem Fall gilt:

$$S_3 = e_A \cdot y_A (1 - y_P) \quad (17)$$

Gleichung (15) läßt sich nun mit Hilfe von Gleichung (7) und obiger Überlegungen in folgender Form schreiben:

$$e_A \frac{[A]_2}{[A]_2 + K_A} = e_P \cdot y_P + e_A \frac{[A]_3}{[A]_3 + K_A} \cdot (1 - y_P) \quad (18)$$

Berücksichtigt man ferner, daß Agonisten schon bei verhältnismäßig geringer Rezeptorbesetzung Wirkungen induzieren, also $[A]_1 \ll K_A$, ändert sich Gleichung (7) in folgende Form:

$$y_A = \frac{[A]_1}{K_A} \quad (19)$$

Angewandt auf Gleichung (18) und nach Umformung erhält man folgende Gleichung nach KAUMANN und MARANO (1973), MARANO und KAUMANN (1976):

$$[A]_2 = e_P \cdot y_P \cdot K_A / e_A + (1 - y_P) [A]_3 \quad (20)$$

Das heißt eine Gleichung der allgemeinen Form:

$$[A]_2 = c + b \cdot [A]_3 \quad (21)$$

Trägt man in einem Koordinatensystem $[A]_2$ gegen $[A]_3$ auf, erhält man eine Gerade mit der Steigung

$$b = 1 - y_P \quad (22)$$

wobei y_P die anteilige Rezeptorbesetzung durch den partiellen Agonisten bei der gegebenen Konzentration $[P]$ angibt. Die Gleichgewichtsdissoziationskonstante läßt sich aus y_P nach Gleichung (7) berechnen:

$$y_P = \frac{[P]}{[P] + K_P} \quad (23)$$

$$K_P = ([P]/y_P) - [P] \quad (24)$$

Es ist möglich, die fraktionelle Rezeptorbesetzungskurve der β -Adrenoceptoren durch den partiellen Agonisten zu berechnen und diese mit der Dosis-Wirkungskurve der gemessenen Effekte des partiellen Agonisten zu vergleichen.

Eine weitere Möglichkeit die fraktionelle Rezeptorbesetzung der β -Adrenoceptoren durch partielle Agonisten (y_P) zu bestimmen, wurde von KAUMANN (1973) beschrieben. Diese Methode lehnt sich eng an die Methode von STEPHENSON (1956) an und ist in Abb. 21 dargestellt. Hier muß keine vollständige Dosis-Wirkungskurve des Agonisten in Gegenwart des partiellen Agonisten ermittelt werden. Man benötigt zwei gleicheffektive Konzentrationen des Agonisten, einmal in Gegenwart des partiellen Agonisten ($[A]_3$) und in Abwesenheit des partiellen Agonisten ($[A]_2$) bestimmt. Ferner muß diejenige Konzentration des Agonisten $[A]_1$ bekannt sein, die die gleiche Wirkung hervorruft, wie der partielle Agonist $[P]$ alleine.

Man setzt nun in Gleichung (18) $e_P \cdot y_P = e_A \cdot y_{A_1}$

Nach Umformung erhält man den folgenden Ausdruck für die fraktionelle Rezeptorbesetzung (y_P) durch die eingesetzte Konzentration des partiellen Agonisten $[P]$:

$$y_P = 1 - \frac{[A]_2 - [A]_1}{[A]_3} \quad (25)$$

Es ist das Ziel dieser Arbeit, an kultivierten isolierten Herzzellen zu untersuchen, ob β -Adrenoceptorliganden chronotrope Wirkungen und die Aktivierung der Adenylyl-Cyclase gleichsinnig beeinflussen. Dabei waren im Einzelnen folgende Fragen zu klären:

- 1) Induzieren Katecholamine und (-)-DCI an kultivierten Herzzellen positiv chronotrope Effekte, die über β -Adrenoceptoren vermittelt werden?
- 2) Die für die Disaggregation der Zellen notwendige Trypsinbehandlung könnte die Affinitätseigenschaften der β -Adrenoceptoren zu Liganden beeinflussen. Affinitätskonstanten voller und partieller Agonisten zum β -Adrenoceptor sollen deshalb an den kultivierten Herzzellen bestimmt werden und mit Konstanten verglichen werden, die an anderen Versuchssystemen ermittelt wurden.
- 3) Bewirken die von uns untersuchten adrenergen Liganden eine Zunahme des zellulären c-AMP-Gehalts, und wird diese Zunahme über β -Adrenoceptoren vermittelt?
- 4) Welche chemischen Eigenschaften der Liganden sind für ihre Affinität zum β -Adrenoceptor, welche für das Ausmaß des durch sie induzierten positiv chronotropen Effekts verantwortlich? Versuche mit dem Propiophenon U-0521 sollten Rückschlüsse über den Einfluß der Amingruppe der Katecholamine bezüglich ihrer Wirkung erlauben.
- 5) Welche Beziehung besteht zwischen
 - a) den durch β -Adrenoceptorliganden hervorgerufenen positiv chronotropen Effekten,
 - b) der durch sie induzierten Zunahme des zellulären c-AMP Gehalts und
 - c) der fraktionellen Rezeptorbesetzungskurve durch die Liganden?
- 6) Ist das cyclische Nukleotid "second messenger" für die von Katecholaminen über den β -Adrenoceptor vermittelten positiv chronotropen Effekte?

2. MATERIAL UND METHODE

=====

2.1 MATERIAL

Kultivation: Kultivationsmedium: Waymouth's Medium MB 752/1
modified without NaHCO_3 (Flow Lab. 2F-030 D)
(WAYMOUTH, 1959)

+ NaHCO_3	2.24 g/l
+ Penicillin	250 000 U/l
+ Streptomycin	0.1 g/l
+ Phenolrot	0.01 g/l

Ca^{2+} -arme Krebslösung: (KAUMANN und WITTMANN, 1975)

NaCl	5.21 g/l	Glucose	1.810 g/l
NaHCO_3	3.70 g/l	Na-Pyruvat	0.550 g/l
KCl	0.372 g/l	Penicillin	250 000 U/l
$\text{NaHPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.268 g/l	Streptomycin	0.1 g/l
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.268 g/l	Phenolrot	0.01 g/l
Fumarsäure	0.58 g/l	pH 7.2	
Glutaminsäure	0.735 g/l	in bidest. Wasser	

Trypsin 2.5% in modified Hanks balanced salt solution:
(Flow Lab. 7-024 D) verdünnt auf 0.125% mit
 Ca^{2+} -armer Krebslösung.

Pferdeserum: Horse Serum Mycoplasma and Bacteriophage
screened (Flow Lab. 4-012 D).

Seren und Trypsinlösungen wurden bei -20°C , die übrigen
Medien bei $+4^\circ \text{C}$ gelagert.

Kulturgefäße: Falcon Tubes 25 cm^2 Wachstumsfläche, ober-
flächenbehandelt (Best. Nr. 3013).

β-Adrenoceptorliganden:

- (-)-Isoprenaline-bitartrat-dihydrat (Sterling-Winthorp),
- (-)-Noradrenaline-bitartrat-monohydrat (Sterling-Winthorp),
- (-)-Dichloroisoprenaline (DCI)-hydrochlorid (Sterling-Winthorp),
- 3',4'-Dihydroxy-β-Methyl-Propiophenon (U-0521) (Upjohn),
- (-)-Bupranolol ((-)-KL 255) (Schwarz-Sanofi Monheim).

Die Katecholamin-Stammlösungen (10 mM) wurden mit 0.1 n HCl auf pH 3 eingestellt und mit 0.04 mM EDTA (Titriplex, Merck)-Lösung auf die Testkonzentrationen verdünnt.

(-)-DCI und (-)-Bupranolol wurden in bidestilliertem Wasser gelöst. Die Stammlösung von U-0521 (10 mM) wurde in 0.04 n HCl angesetzt.

Die Lösungsmittel haben, in den im Experiment eingesetzten Konzentrationen, an der Einzelzelle weder eine Eigenwirkung noch beeinflussen sie die Effekte der Drogen.

3-Isobutyl-1-Methylxanthin (MIX) (Ega Chemie Nr. 02488). Stammlösung 0.1 M in bidestilliertem Wasser, das mit NH_3 auf pH 8 eingestellt wurde. Die Zugabe des Lösungsmittels allein veränderte den pH im Testgefäß nicht und zeigte keine Eigenwirkung, noch beeinflusste es die Reaktivität der Zellen auf Testsubstanzen.

Die Reinheit des U-0521 wurde von Dr. Mathiesen (Institut für Physiologische Chemie II der Universität Düsseldorf) gaschromatographisch untersucht. Es verhielt sich als eine einheitliche Substanz. Da zur Synthese von U-0521 weder als Ausgangssubstanz noch als Reagenz ein Amin verwendet wird, ist eine Verunreinigung der Substanz durch Katecholamine ausgeschlossen (Dr. P.W. O'Connell, Upjohn Co., Kalamazoo, persönliche Mitteilung).

3',5'-cAMP Test: Radioisotopen-Verdünnungstest mit A-3:5-MP-bindendem Protein (Boehringer Mannheim Best. Nr. 15289).

2.2 METHODE

2.2.1 Kultivation von Herzzellen (KAUMANN und WITTMANN, 1975)

2.2.1.1 Präparation von Rattenherzzellen

Zellkulturen wurden von Herzen 1-3 Tage alter, neugeborener Wistar II-Ratten hergestellt. Die Ratten wurden durch Genickbruch getötet und mit 70%igem Alkohol an der Körperoberfläche desinfiziert. Alle weiteren Präparationsschritte erfolgten unter sterilen Bedingungen. Mit jeweils einem anderen Präparierbesteck wurden zuerst die Bauch- und Brusthaut und darauf der Brustkorb entfernt. Das nun freiliegende Herz wurde herauspräpariert. Blutgerinnsel und zerfallene Erythrozyten wirken bei weiterer Aufarbeitung toxisch. Deshalb wurden die Herzen von 10-20 Ratten in einer modifizierten Ca^{2+} -armen Krebslösung gesammelt, anschließend zerschnitten und mehrmals mit frischer Ca^{2+} -armer Lösung gespült. Ca^{2+} -Mangel verhindert die Blutgerinnung, lockert Zellkontakte (ZEIDMANN, 1947) und erleichtert den Angriff des Trypsins, mit dessen Hilfe die Zellen aus dem Gewebeverband herausgelöst werden (MOSCONA, 1952).

Die Trypsinlösung wirkt bei pH 7.8 und 35-36° C auf die Gewebestückchen ein. Dieser Vorgang dauert 10 Minuten und wird bis zu fünf Mal wiederholt. Der erste Überstand, in dem sich vor allem Erythrozyten und Bindegewebszellen befinden, wird verworfen. Die Zellen aus allen weiteren Überständen werden bei 200 g sedimentiert und in Kulturmedium (Waymouth's Medium + 10-15% Pferdeserum) aufgenommen. Nach Resuspension vereinigt man die Zellen aus jedem Präparationsschritt. Diese Suspension wird durch eine Glasfritte G1 (Schott Mainz) filtriert, um Gewebeteile und Muskelfasern von den isolierten Zellen abzutrennen. Die Zellen werden noch zwei Mal zentrifugiert und mit Kulturmedium auf eine Zellkonzentration von etwa 5×10^5 Zellen

pro ml (Zählkammer nach Thoma) eingestellt. Jeweils 5 ml dieser Zellsuspension werden in Kulturgefäße (siehe Kapitel Material) gefüllt.

Präparation von Katzenherzzellen

Auf die gleiche Weise haben wir Herzzellkulturen von Katzen hergestellt. Hierzu verwendeten wir entweder neugeborene Tiere oder Embryonen, die 1-3 Tage vor der Geburt dem Uterus entnommen wurden.

Präparation embryonaler Hühnerherzen

Die Zellkulturen wurden aus 11-13 Tage alten embryonalen Hühnerherzen gewonnen. Dafür müssen Hühnereier bei 37° C und 95% Luftfeuchtigkeit in einem Brutschrank bebrütet werden. Nach steriler Entnahme der Hühnerembryonen läuft die Präparation nach dem oben beschriebenen Schema ab. Da die Hühnerherzzellen leichter als Ratten- und Katzenherzzellen von 0.125%iger Trypsinlösung aus dem Gewebe gelöst werden können, ist es möglich, die Hühnerherzen jeweils kürzere Zeiten (7 Minuten) in Kontakt mit dem Enzym zu lassen.

2.2.1.2 Kulturbedingungen

Kulturmedium

Als Kulturmedium verwendeten wir Waymouth's Medium MB 752/1, das mit 10-15% Pferdeserum versetzt wurde. Um bei Versuchen von CO₂-Begasung unabhängig zu werden, versuchten wir das Kulturmedium zu modifizieren: anstatt NaHCO₃ wurde 20 mM Hepes (2-(4-(Hydroxyäthyl)-piperazinyl)-(1)-äthansulfonsäure) als Puffer verwendet. Um den dadurch entstehenden Na⁺-Mangel auszugleichen, wurde dem Medium 1.55 g/l NaCl zugesetzt. Die Osmolarität dieses Mediums unterscheidet sich nicht von der des Kulturmediums. Das modifizierte Medium erweist sich jedoch

nicht als vollkommener Ersatz des mit Bikarbonat gepufferten Mediums, da nach längerer Kultivation mit diesem Puffer Vakuolen im Cytoplasma der kultivierten Zellen zu erkennen sind. Ähnliche strukturelle Schäden nach Kultivation mit Hepes-Puffer sind auch von GOSHIMA (1973) beschrieben worden. Tauschtmann jedoch kurz vor Versuchsbeginn Bikarbonat-gepuffertes Medium gegen Hepes-gepuffertes Medium aus, erhält man die gleichen Versuchsergebnisse wie in Bikarbonat-gepuffertem Medium.

Aufzucht der Zellkulturen

Die Zellen werden bei 35-36° C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre kultiviert. Außerdem wird ein pH von 7.2 durch Begasung der Kulturen mit einem CO₂-Luft-Gemisch aufrecht erhalten. Innerhalb von 24 Stunden setzen sich die Zellen am Boden des Kulturgefäßes fest; erst danach wird das Medium gewechselt, damit Zellbruchstücke, verbliebene Blutkörperchen sowie Stoffwechselprodukte beseitigt werden. Weitere Medienwechsel folgten im Abstand von 1-2 Tagen.

Beobachtung der Zellkulturen

Die Entwicklung der Zellen wurde täglich überprüft. Um eine Kontamination der Kulturen zu vermeiden, ist für diesen Zweck ein Umkehrmikroskop (Olympus CK) an einem sterilen Arbeitsplatz installiert. Mikrophotographien wurden mittels Photoaufsatz Olympus PM-6 aufgenommen, die Belichtungszeiten anhand einer Belichtungsreihe abgeschätzt. Beobachtungen von insgesamt 1231 Zellkulturen werden im Folgenden dargestellt (Tabelle I).

Tabelle I: Anzahl der Zellkulturen und deren Verwendungszweck

Es wurden verwendet für:	Ratten-	Hühner-	Katzen-
	H e r z z e l l e n		
a) Bestimmung der pos. chronotropen Wirkung	123	32	18
b) cAMP Test	894	184	-

2.2.2 Bestimmung des positiv chronotropen Effekts von β -Adrenoceptorliganden

2.2.2.1 Versuchsplatz zur Messung von Zellkontraktionen

Der Versuchsplatz konnte im Laufe der experimentellen Durchführung der Arbeit verbessert werden, dabei wurden drei Registrieranordnungen verwendet:

Versuchsaufbau 1 (KAUMANN und WITTMANN, 1975)

Zwei Umkehrmikroskope (Olympus CK) sind in einem Inkubator, dessen Temperatur auf 35-36° C eingeregelt ist, aufgestellt. Der pH des Kulturmediums wird durch Einleiten von CO₂ in den Versuchsraum aufrecht erhalten, und die pH-Konstanz im Kulturmedium mit einem pH-Meter überprüft. Die Luft im Inkubator wird feucht gehalten und dadurch das Einengen des Kulturmediums durch Verdampfen von Wasser verhindert. Zusätzlich wird das Volumen in den Versuchgefäßen nach Versuchsende überprüft.

Die Anzahl der Kontraktionen einer spontan schlagenden Zelle wird jede Minute 10 Sekunden lang gezählt und die Frequenz berechnet. Die Dauer der Zählzeit gibt ein elektronischer Summer an, der jede Minute 10 Sekunden lang ein akustisches Signal ertönen läßt. Ein 53226 B "time counter DVM" (Hewlett-Packard) erleichtert das Zählen.

Um ein zusätzliches Erwärmen der Kulturen durch die Mikroskopbeleuchtung zu vermeiden, wird die Lampe nur zum Zählen höchstens 15 Sekunden innerhalb einer Minute angeschaltet. Nach Einbau des Wärmeschutzfilters in den Strahlengang des Mikroskops war diese Maßnahme nicht mehr nötig.

Versuchsaufbau 2 (KAUMANN und Mitarbeiter, 1977a)

Die linke Seite der Abbildung 5 illustriert den fortgeschrittenen Aufbau des Registriersystems für Zellkontraktionen.

Ein Leitz Diavert Umkehrmikroskop ist auf einem Wägetisch schwingungsfrei installiert. Das Mikroskop ist von einem PVC-Gehäuse umgeben, dessen Innenraum auf konstanter Temperatur ($35 \pm 1^\circ \text{C}$) gehalten wird. Die Temperatur überwacht ein elektronischer Temperaturfühler, der bei Temperaturschwankungen, die z.B. durch den Experimentator bedingt sind, ein akustisches Signal ertönen läßt. Der pH im Kulturmedium wird durch Einleiten von vorgewärmtem CO_2 über die Oberfläche des Mediums aufrechterhalten. Zur Registrierung der Zellkontraktionen wird das mikroskopische Phasenkontrastbild der Zelle von einer Fernsehkamera (Philips) aufgenommen und auf einen Fernsehmonitor (Saba) übertragen.

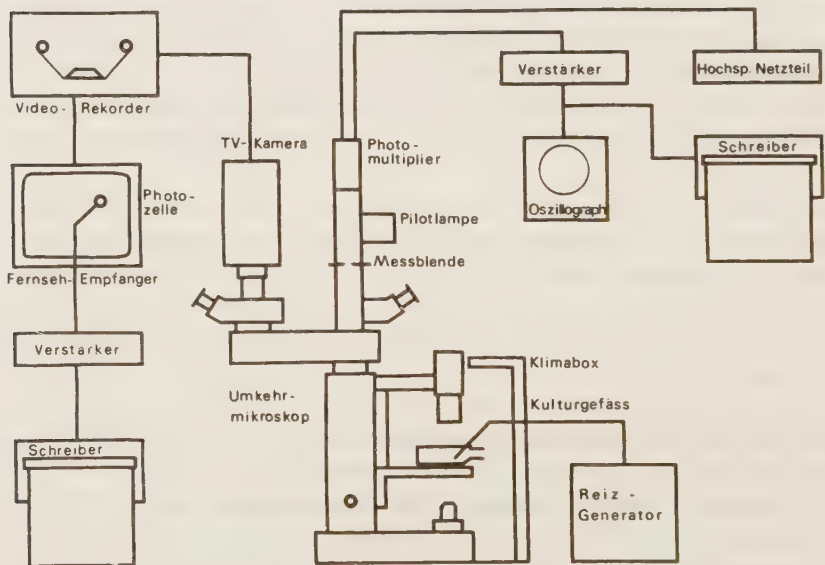


Abb. 5: Versuchsaufbau und Meßeinrichtung zur Bestimmung der Schlagfrequenz von spontanschlagenden kultivierten Herzzellen. Erklärung im Text.

Gleichzeitig kann das Bild mit einem Video Recorder (Grundig) aufgezeichnet werden. Dank der Aufzeichnung konnten bis zu vier unabhängig voneinander schlagende Zellen während eines Experimentes beobachtet und ihre positiv chronotrope Reaktion nach Zugabe von β -Adrenoceptorliganden ausgewertet werden.

Die Zellkontraktionen verursachen eine Änderung der Lichtintensität von Zellbezirken auf dem Fernsehschirm. Diese Änderungen werden von einer LDR-Photozelle aufgezeichnet. Die Photozelle (BPY 61 Siemens) ist in einem Kanal von 2 mm $\varnothing$ befestigt, der mitten durch einen schwarzen PVC-Block ($\varnothing$ 20 mm) gebohrt ist. Der Kanal dient als Meßblende, der PVC-Block verhindert einen Einfluß der Raumbeleuchtung auf die Photozelle. Der Plastikblock wird mit Klebeband auf dem Fernsehschirm befestigt. Das Bild der kontrahierenden Zellen auf dem Fernsehschirm wird unter der Photozelle so justiert, daß während der Kontraktionsintervalle im Meßfeld dunkle Zellteile vorherrschen, dagegen bei Kontraktion helle Zellteile auftauchen. Zusätzlich wird das Phasenkontrastbild so eingestellt, daß Zellgrenzen und Zellorganellen einen Halo-Effekt hervorrufen.

Das Ausgangssignal der Photozelle wird durch einen Operationsverstärker verstärkt und, um die Zeilenfrequenz des Fernsehers zu eliminieren, durch eine RC-Kombination gefiltert. Die Signale werden auf einem Shimadzu U 125 MU Schreiber aufgezeichnet (Abb. 6) (ähnliche Systeme wurden auch von BARRY und Mitarbeitern (1975), THOMPSON und Mitarbeitern (1975) sowie von OKARMA und KALMAN (1969) beschrieben).

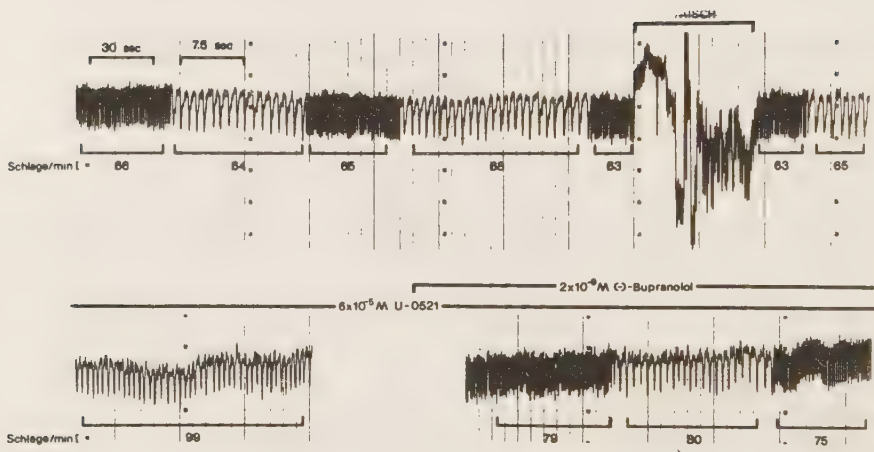


Abb. 6: Registrierbeispiel nach Versuchsaufbau 2:
Hemmung des positiv chronotropen Effekts
von U-0521 durch (-)-Bupranolol.
Obere Spalte: Grundfrequenz der Zellen.
Mischen des Mediums verändert die Frequenz
der Zellen nicht.
Untere Spalte: Wirkung von 6×10^{-5} M U-0521
auf die Schlagfrequenz der Zellen und Änderung
der Frequenz 3 Minuten nach Zugabe von
 2×10^{-9} M (-)-Bupranolol.

Versuchsaufbau_3 (SCHWAMBORN und Mitarbeiter, 1976)

Das Registriersystem wurde in Anlehnung an KAUFMANN und Mitarbeiter (1969) erweitert (Abb. 5). Dem Umkehrmikroskop (Diavert Leitz) ist ein Mikroskopphotometer (MPV Leitz) angeschlossen. Das in der Zwischenbildebene des Mikroskops entworfene Bild des Objekts wird in der Ebene einer im Photometer

eingebauten variablen Meßblende erneut abgebildet. Meßblende und Objekt können über eine Einstellupe gemeinsam beobachtet werden. Es ist möglich, Größe und Form der Meßblende dem Objekt optimal anzupassen, so daß die durch Zellkontraktionen bedingten Helligkeitsschwankungen von dem Photomultiplier (MFLK Knott) optimal gemessen werden können. Die Signale des Photomultipliers werden durch einen Operationsverstärker verstärkt. Die Kontraktionen können mit einem Oszillographen beobachtet und mit einem Watanabe-Schreiber aufgezeichnet werden (Abb. 7).

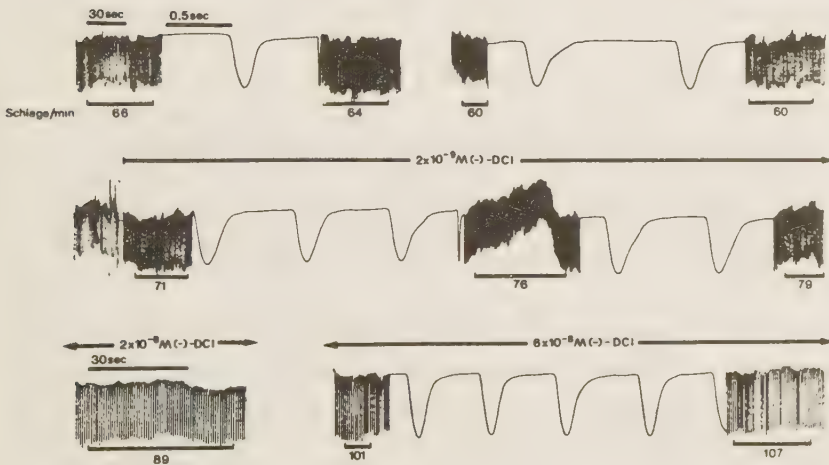


Abb. 7: Registrierbeispiel Versuchsaufbau 3:
Positiv chronotroper Effekt von (-)-DCI, beobachtet an kultivierten Rattenherzzellen.
Obere Spalte: Grundfrequenz der Zelle vor und nach Mischen des Mediums.
Mittlere Spalte: Registrieren der Grundfrequenz, darauf Zugabe von 2×10^{-9} M (-)-DCI (Einsetzen des Effekts).
Untere Spalte: Effekt von 2×10^{-8} M und 6×10^{-8} M (-)-DCI jeweils 2 Minuten nach Zugabe der Substanzen.

2.2.2.2 Versuchsablauf bei der Bestimmung von chronotropen Effekten an kultivierten Herzzellen

Vor Versuchsbeginn wird die Kultur mit 5 ml frischem Medium beschickt und am Kreutztisch des Mikroskops befestigt. Eine Vorrichtung zum Durchmischen des Mediums mit den zugegebenen Substanzen wird angebracht. Diese besteht aus einer in das Medium eintauchenden Kanüle (No. 1), die über einen 50 cm langen sterilen Plastikschauch mit einer 20 ml Spritze verbunden ist. Um die zugesetzten Substanzen mit der Kultivationsflüssigkeit gut zu durchmischen, wird 4-5 Mal etwa die Hälfte des Mediums angesaugt und wieder in das Kulturgefäß gedrückt. Wir konnten durch Zusetzen eines Farbstoffes in das Medium eine ausreichende Vermischung bestätigen.

Testzellen werden nach folgenden Kriterien ausgewählt:

- a) Ihre Schlagfrequenz muß über 5-10 Minuten konstant sein (unter Zellen, die mit konstanter Frequenz schlagen, verstehen wir Zellen, deren Schlagzahl pro Minute nicht mehr als 5-8% vom Mittelwert der Frequenz, die durch Registrierung über einen Zeitraum von 10 Minuten bestimmt wurde, abweicht).
- b) Der Mischvorgang darf keine Auswirkungen auf die Spontanfrequenz haben.

Nach Registrieren der Kontrollfrequenz werden die Testsubstanzen mit Hamilton μ l-Spritzen zugesetzt. Durch wiederholtes Mischen erreicht man eine homogene Verteilung der Testsubstanzen.

Manche Versuchsabläufe erfordern ein Auswaschen der β -Adrenoceptorliganden. Dazu wird das Medium vollständig durch die Spritze angesaugt und frisches Medium zugefügt. Dieser Vorgang wird bis zu fünfmal in Abständen von 3-6 Minuten wiederholt.

Zellen, die nach Auswaschen ihre Ausgangsfrequenz nicht wieder erreichen, werden für weitere Versuche nicht mehr verwendet.

Dosis-Wirkungskurven: Kumulative Kurven der positiv chronotropen Wirkung von β -Adrenoceptorliganden werden durch aufeinanderfolgende Zugabe der Drogen in das Medium bestimmt. Dabei wird die Gesamtkonzentration der Testsubstanzen in Beträgen einer halben bzw. drittel log-Einheit erhöht. Nach Zugabe muß genügend Zeit verstreichen, bis jeweils ein Gleichgewicht der Wirkung erreicht ist. Unter diesen Versuchsbedingungen konnten 4 sukzessive Dosis-Wirkungskurven für die positiv chronotrope Wirkung von (-)-Isoproterenol an einer Zelle bestimmt werden.

2.2.3 cAMP Test (KAUMANN und Mitarbeiter, 1977a)

Die Methode nach BROWN und Mitarbeitern (1971) und GILMAN (1970) modifizierten wir unseren Anforderungen entsprechend. Zuerst wird die Anzahl der Zellen in dem Testgefäß bestimmt. Dafür teilten wir jede Kultur in neun gleiche Zählflächen ein. In jeder dieser Flächen zählten wir die Zellen, die längs der Mikrometermarken eines Okularmikrometers liegen und außerdem an einem beliebigen Platz in der Kultur. Der Mittelwert der zehn Zählungen wird gebildet und die Zellzahl pro Kultur berechnet.

Chargen mit ungefähr gleicher Zellzahl werden für vergleichende Tests ausgewählt. Dann beschickt man die Kulturgefäße, je nach Versuchsbedingung, mit 5 ml frischem serumfreien oder serumhaltigen Medium. Man läßt die Zellen 50-60 Minuten mit dem frischen Medium äquilibrieren. Darauf werden die Substanzen, deren Wirkung auf den zellulären cAMP Gehalt getestet werden

soll, mittels Hamilton μ l-Spritzen in das Kulturmedium injiziert und nach Verschliessen des Kulturgefäßes durch dreimaliges Schütteln mit dem Medium vermischt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wird das Medium verworfen oder, um den cAMP Gehalt des Mediums zu bestimmen, aufbewahrt. Spuren des Mediums, die im Kulturgefäß haften bleiben, werden mit einer Pasteur-Pipette abgesaugt.

Nachdem das Medium entfernt ist, taucht man das Kulturgefäß sofort in flüssigen Stickstoff. Der Vorgang vom Dekantieren des Mediums bis zum Einfrieren in flüssigem Stickstoff dauert durchschnittlich 15 Sekunden. Nach 10-15 Sekunden in flüssigem Stickstoff sind die Zellen eingefroren. Anschliessend wird 1 ml eisgekühlte 6%ige (w/v) Trichloressigsäure in das Kulturgefäß pipettiert und die so behandelte Kultur sofort bei -20° C gelagert. Nach Auftauen kratzt man die Zellen mit einer gebogenen Pasteur-Pipette vom Boden des Kulturgefäßes ab und gibt die Zellbruchstücke in ein Zentrifugenglas. Danach wird das Kulturgefäß zweimal mit je 1 ml 6% TCA gespült, um alle Zellbruchstücke zu sammeln. Dabei überprüft man, ob die Zellbruchstücke vollständig aus dem Kulturgefäß entfernt sind. Die Proben werden anschließend 1 Minute in kochendes Wasser getaucht, um die Proteine vollständig zu denaturieren. Nach Abkühlen werden die Proben 10 Minuten bei 250 g zentrifugiert. Das Sediment wird zur Proteinbestimmung nach LOWRY und Mitarbeitern (1951) weiterverwendet. Der Überstand wird viermal mit je 2 ml Diäthyläther ausgeäthert.

Das Einengen der Proben erfolgte nach zwei Methoden:

- a) Nach Abnehmen des Äthers wird die cAMP enthaltende Flüssigkeit bei $30-40^{\circ}$ C über Nacht eingedampft.
- b) Nach Abnehmen des Äthers verdampft man erst den verbliebenen Anteil Äther durch 2-4 Stunden Inkubation bei 30° C. Anschließend werden die Proben bei -20° C eingefroren und 12 Stunden lang in einer GT 2-Gefriertrocknungsanlage (Leybold-Heraeus) eingeengt.

Die Substanzen nimmt man je nach zu erwartendem cAMP-Gehalt in 0.5 ml oder 1 ml 0.2 M Acetat-Puffer pH 4 auf. Die Bestimmung des cAMP-Gehalts erfolgt nach der Methode von GILMAN (1970) mit Hilfe eines Radioisotopen-Verdünnungstests (Boehringer No. 15289). Da Spuren von Medium in den Proben die Nullwerte beeinflussen, wird jeder Probe inklusive der Standardwerte 10 µl Kulturmedium zugesetzt, anstelle der 10 µl bidestillierten Wassers laut Testvorschrift. Die Eichkurve ist linear zwischen 1-20 pMol cAMP.

Außerdem wird parallel zu den Proben eine Mediumkontrolle ohne Zellen aufgearbeitet. Sie dient als Bezugsnullwert bei der Bestimmung des cAMP-Gehalts und bei der Proteinbestimmung. Standardeichkurven, die in diesen Mediumkontrollen gemacht werden, unterscheiden sich nicht von den ermittelten Eichkurven.

Die Wiederauffindung des cAMP wurde getestet, indem wir 60 pMole, 100 pMole und 200 pMole cAMP zu Zellbruchstücken in 3 ml 6% TCA pipettierten. In der folgenden Tabelle II sind die Recoveries verschiedener Versuche zusammengefaßt:

Tabelle II: Analytischer Fehler bei der cAMP Bestimmung

Vorgegeben:	60	100	200 pMole
Wiedergefunden:	$\bar{x} \pm SD (n)$		
<u>Verfahren:</u>			
Einengen bei 30-40° C	56.8 ± 11.9 (3)	90.5 ± 11.0 (6)	180.0 ± 20 (3)
Gefrier-trocknung	56.3 ± 13.0 (3)	97.0 ± 18.0 (3)	180.0 ± 16 (3)

2.2.4 Auswertung der Versuche

Statistische Angaben

Die Ergebnisse sind als Mittelwerte berechnet und als Mittelwerte ($\bar{x}$) $\pm$ mittlerer Fehler des Mittelwertes angegeben (SEM)

$$\bar{x} \pm \text{SEM} \quad (n)$$

(n) gibt die Anzahl der Einzelwerte an, die zur Berechnung des Mittelwertes herangezogen wurden. Die Standardabweichung (SD) errechnet man aus dem mittleren Fehler des Mittelwertes durch folgende Formel

$$\text{SEM} = \text{SD} / \sqrt{n}$$

Wird die Standardabweichung angegeben, so ist dies besonders angeführt

$$\bar{x} \pm \text{SD}$$

Die Signifikanzen wurden mittels t-Test festgestellt. Die p-Werte sind nur angegeben, wenn die Unterschiede signifikant sind.

Vergleich von Dosis-Wirkungskurven

Um Dosis-Wirkungskurven vergleichen zu können, bieten sich zwei Parameter an:

- a) Die erreichte Maximalwirkung: Die maximale stimulierende Wirkung von partiellen Agonisten ist kleiner als diejenige, die Katecholamine verursachen. Ein Maß für die Wirkung gibt die "intrinsic activity" α (ARIENS, 1966) an, nämlich das Verhältnis der Maximalwirkung des partiellen Agonisten zu der Maximalwirkung eines vollständigen Agonisten (Katecholamin).
- b) Konzentrationsabhängigkeit der Wirkung: Dosis-Wirkungskurven werden mit Hilfe der halbmaximalen Wirkungen EC_{50} , den Wendepunkten der Kurven, verglichen.

Vergleich von Kinetiken: Als Vergleichsparameter von Kinetiken verwendeten wir die Zeit, bei der eine halbmaximale Wirkung eingetreten ist ($t_{1/2}$).

3. E R G E B N I S S E =====

3.1 MORPHOLOGIE DER HERZZELLKULTUREN

Verwendet man Zellkulturen als Versuchsobjekt, darf nicht vergessen werden, daß die gezüchtete Zelle ein Modellsystem ist. Die Einzelzelle ist durch die für eine Kultivation notwendige Aufarbeitungstechnik und durch die Kultivation selbst Einflüssen ausgesetzt, die mit den Verhältnissen der Zelle im Organismus nicht vorbehaltlos gleichzusetzen sind. Deshalb ist es notwendig, die morphologischen und physiologischen Eigenschaften der zu untersuchenden Zellen genau zu kennen, um aus Versuchsergebnissen, die mit Hilfe dieser Zellen gewonnen wurden, definierte Aussagen über allgemeine physiologische Vorgänge treffen zu können. Resultate, die von anderen Autoren anhand von Versuchen an ähnlichen Zellsystemen gefunden wurden, können für die eigenen Zellkulturen erst nach eingehendem Vergleich der Kultivations- und Aufarbeitungsbedingungen übernommen werden.

3.1.1 Rattenherzzellen

Nach Aussäen der Zellsuspension in ein Kulturgefäß setzen sich die Zellen am Boden ab und beginnen festzuwachsen. In den ersten 6 Stunden sind sie abgerundet, ungefähr 15-30 μ im Durchmesser und optisch dicht. Dann strecken sich die Zellen und bilden spindelförmige Ausläufer. Jetzt kann man die ersten vereinzelten Zellkontraktionen erkennen, die meistens noch unregelmäßig und sehr schwach sind. Nach 24 Stunden Kultivation können zwei Zelltypen unterschieden werden, nämlich stark konturierte Zellen (d.h. Zellen, deren Zellrand im Phasenkontrastmikroskop einen Halo aufweisen; MARK und STRASSER, 1966) und fibroblastenartige Zellen (Abb. 8).



Abb. 8: Verschiedene Zelltypen in 3 Tage alten Rattenherzzellkulturen.

- K) Stark konturierte Zellen: Die Umrisse der Zellen erscheinen in diesem Fall verschwommen, da sie im Augenblick der Aufnahme kontrahierten.
- F) Fibroblastenartige Zelle: Typisch ist der große Kern mit den Nukleoli. Die Zellgrenzen sind schwer zu erkennen.
- T) Diese beiden Zellen befinden sich gerade in Zellteilung.

3.1.1.1 Stark konturierte Zellen

24 Stunden nach Ansetzen der Kultur kann man bei den meisten stark konturierten Zellen die Zellkerne erkennen. Der Zellkörper ist spindelförmig und erscheint im mikroskopischen Bild dick. Einige dieser Zellen kontrahieren sich spontan, jedoch sind die Kontraktionen schwach und erfolgen in unregelmäßigen Abständen. Häufig setzen die Kontraktionen längere Zeit aus. Am zweiten Tag haben sich die stark konturierten Zellen abgeflacht. Man kann jetzt Kern, Nukleolus, eine Ansammlung von Mitochondrien sowie fibrilläre Strukturen erkennen. Während der ersten Kultivationsstage findet eine starke Zellvermehrung statt, dabei nimmt vor allem die Anzahl der stark konturierten Zellen zu. Am 3. Kultivationsstag schlagen 80-90% der stark konturierten Zellen spontan. Wurde bei Beginn der Kultivierung eine Zelldichte von 2×10^5 Zellen pro Kulturgefäß eingesetzt, so ist nach 3 Tagen die Zelldichte so groß, daß der Boden des Kulturgefäßes optimal mit isoliert liegenden Einzelzellen bedeckt ist. Unter dieser Bedingung schlagen die Zellen unabhängig voneinander und mit unterschiedlichen Frequenzen.

Nach 5 Tagen Kultivierung ist die Kultur zum großen Teil zu synchron schlagenden Zellrasen zusammengewachsen. Zwei verschiedene Typen stark konturierter Zellen können unterschieden werden: Spindelförmige und trapezförmige Zellen. Der Übergang zwischen beiden Zelltypen ist fließend. In ein und derselben Kultur treten ebenfalls zwei verschiedene Wachstumsformen der Zellrasen nebeneinander auf:

- a) Die Zellen lagern sich ohne Zwischenraum aneinander.
- b) Die Zellen sind nur durch Ausläufer verbunden.

Beide Wachstumsformen sind nicht eindeutig voneinander abzugrenzen. Zum größten Teil schlagen diese Zellrasen synchron. In einigen Fällen bilden sich jedoch verschiedene Pulsationszentren innerhalb einer Kultur aus.

Nach 15 Tagen Kultivation können Degenerationerscheinungen festgestellt werden. Die Zellen verlieren ihre konturierte Struktur, die Spontanfrequenz der synchron schlagenden Zellrasen wird langsamer und erlischt allmählich. Kontraktionen sind dann nur noch vereinzelt an wenigen Zellen festzustellen. Außerdem kann man Vakuolen im Cytoplasma erkennen.

3.1.1.2 Fibroblastenartige Zellen

Die fibroblastenartigen Zellen breiten sich flacher auf dem Boden des Kulturgefäßes aus als die stark konturierten Zellen. Dadurch erscheint ihr Cytoplasma heller und klarer. Der Zellkern ist größer als der Kern der stark konturierten Zellen und enthält mehrere Nukleoli. Die Zellgrenzen sind sogar im Phasenkontrastbild schwer zu erkennen. Diese Zellen kontrahieren nie.

3.1.1.3 Anteil der stark konturierten und fibroblastenartigen Zellen in einer Kultur

Das Verhältnis beider Zelltypen (stark konturierter zu fibroblastenartigen Zellen) hängt einerseits von der sorgfältigen Durchführung der Trypsinierung ab. Zu lange Trypsinwirkung auf die Zellen erhöht den Prozentsatz der fibroblastenartigen Zellen. Andererseits ist der Anteil der stark konturierten Zellen in einer Kultur vom Titer der zur Kultivation eingesetzten Zellen abhängig. Werden nach der Präparation $1-2 \times 10^5$ Zellen pro Kulturgefäß zur Kultivation eingesetzt, überschwemmen die fibroblastenartigen Zellen die stark konturierten Zellen, da anscheinend ihre Teilungsrate stärker ist. Nach 5 Tagen sieht man in diesem Fall etwa 20% stark konturierte Zellen innerhalb eines Monolayers

von fibroblastenartigen Zellen. Setzt man $2-3 \times 10^5$ Zellen pro Kulturgefäß ein, erhält man am 3. Tag etwa 70% stark konturierte Zellen. An den folgenden Tagen nimmt der Fibroblastenanteil zu, sodaß am 5. Tag nach Kulturansatz nur etwa 50% stark konturierte Zellen aufzufinden sind. Dieses Verhältnis bleibt bis zum 15. Tag erhalten, dann beginnt die Degeneration der stark konturierten Zellen. Werden $3-5 \times 10^5$ Zellen pro Kulturgefäß eingesetzt, erhält man Kulturen mit 80-90% stark konturierten Zellen, die fast alle schlagen. In diesen Kulturen bildet sich schon am 3. Kultivationsstag ein synchron schlagendes Monolayer von Zellen. Die stark konturierten Zellen schlagen in diesen Kulturen ebenfalls 15 Tage lang.

Tabelle III: Abhängigkeit des prozentualen Anteils stark konturierter Zellen vom Kultivationsalter und von der Ausgangszelldichte/Kulturgefäß

Zellzahl pro Kulturgefäß bei Kultivationsbeginn	% stark konturierte Zellen			
	Tag nach Kultivationsbeginn			
	3.	4.	5.	15.
$1 - 2 \times 10^5$			20 Z	D
$2 - 3 \times 10^5$	70	Z	50	D
$3 - 5 \times 10^5$	80-90 Z			D

Z: Zellrasen

D: Degenerationserscheinungen

3.1.1.4 Normales physiologisches Verhalten der Rattenherzzellen, Charakteristik der Schrittmacheraktivität

Eine Schrittmacheraktivität einzelner stark konturierter Zellen kann man im Durchschnitt 10 Stunden nach Ansetzen der

Kultur beobachten. In einzelnen Fällen konnte jedoch schon unmittelbar nach dem Absetzen der Zellen auf den Boden des Kulturgefäßes Spontanaktivität festgestellt werden. Am ersten Kultivationsstag schlagen nur wenige der stark konturierten Zellen. Man kann diese Kontraktionen kaum erkennen, da die Zuckungen sehr schwach sind. Die Schlagfrequenz der Zellen ist langsam und unregelmäßig. Oft setzt die Zelle, die man gerade beobachtet, mit den Kontraktionen aus, um dann wieder mit neuer Frequenz zu schlagen, oder sie stellt über längere Zeit ihre Spontanaktivität völlig ein.

Am 2. Tag nach Ansetzen der Kultur schlagen, je nach den Kultivationsbedingungen, 50-80% der stark konturierten Zellen. Die Kontraktionen sind kräftiger und regelmäßiger als diejenigen, die man am Vortag beobachten konnte, jedoch setzen die Zellen immer noch manchmal mit dem Schlagen aus.

Am 3. Tag der Kultivation kontrahieren 80-90% der stark konturierten Zellen. Jedoch schlagen nur etwa 50% der Zellen mit konstanter Frequenz. Alle Zellen kontrahieren mit gleichbleibender Stärke.

Nach 5 Tagen bilden sich synchron und mit stabiler Frequenz schlagende Zellrasen. Nur etwa 10% der registrierten Zellrasen kontrahierten zu unregelmäßig, um sie für Versuche zu verwenden. Die Schlagfrequenz von spontan aktiven, isoliert liegenden Zellen nimmt bis zum 3. Tag der Kultivation zu und erreicht dann im Mittel eine Frequenz von etwa 70 Schlägen pro Minute. Synchron schlagende Monolayer kontrahieren meistens mit höherer Frequenz als die in der gleichen Kultur isoliert liegenden Einzelzellen.

Für Experimente, in denen die chronotrope Wirkung von Substanzen getestet wurde, verwendeten wir konstant schlagende isoliert liegende Zellen aus Kulturen, die 2-7 Tage alt

waren und deren Kontraktionsfolge innerhalb eines Frequenzbereichs von 60-100 Schlägen/Minute lag. In Versuchen, bei denen der 3',5'-c-AMP Gehalt der Zellen festgestellt wurde, verwendeten wir 5-7 Tage alte Kulturen. Die Zellen in diesen Kulturen waren zu Zellrasen zusammengewachsen, in denen 70-90% der Zellen schlugen. Als Kontrollversuch wurde die chronotrope Wirkung von Testsubstanzen in gleichartigen Kulturen gemessen.

3.1.2 Katzenherzzellen

Die Entwicklung der kultivierten Katzenherzzellen verläuft ähnlich der der Rattenherzzellen. 1-2 Tage nach Kultivationsbeginn setzen sich die isolierten Katzenszellen am Boden des Kulturgefäßes fest. Sie wachsen aus und nehmen meist spindelförmige Gestalt an. Man kann auch hier zwei Zelltypen unterscheiden: Fibroblastenähnliche und stark konturierte Zellen. Kontraktionen sind 3-4 Tage nach Kultivationsbeginn zu beobachten. Nur etwa 30-50% der Zellen schlagen spontan. Der Anteil der kontraktilen Zellen wird auch in älteren Kulturen nicht größer. In 15-20 Tage alten Kulturen zeigen sich die ersten Degenerationserscheinungen.

3.1.3 Hühnerherzzellen

Die isolierten Zellen setzen sich nach 12-24 Stunden am Boden des Kulturgefäßes fest. Die Zelltypen und deren Entwicklung in Kultur ähneln denen, die bei der Kultivation von Rattenherzzellen beschrieben sind. Die ersten Spontankontraktionen kann man bei Zellen erkennen, die 1 Tag alt sind. Im Verlauf der Kultivation schlagen jedoch nie mehr als 50% der Zellen. Eine eindeutige Zuordnung der einzelnen Zellen zum fibroblastenartigen und stark konturierten Typ läßt sich schwer

treffen, da sich die kultivierten Hühnerherzzellen in ihrer Morphologie kaum unterscheiden.

Vom 10. Tag der Kultivation an nimmt der Anteil der kontraktile Zellen ab. Oft kann man beobachten, daß alle Zellen einer Kultur oder sogar einer Zellcharge, die älter als 10 Tage sind, über Nacht ihre Spontanaktivität einstellen. In einigen Fällen war es möglich, Zellen durch Mediumwechsel wieder zu aktivieren.

3.2 UNTERSUCHUNG DES POSITIV CHRONOTROPEN EFFEKTS VON β -ADRENOCEPTORLIGANDEN

3.2.1.1 Positiv chronotroper Effekt von Katecholaminen ((-)-Isoproterenol, (-)-Noradrenalin) an kultivierten Rattenherzzellen

Der früheste Zeitpunkt, zu dem wir die Wirkungen von Katecholaminen auf die Spontanaktivität kultivierter Rattenherzzellen untersuchten, lag 26 Stunden nach Ansetzen der Kultur. Sowohl in diesen Kulturen als auch in allen älteren Kulturen verursachen Katecholamine einen positiv chronotropen Effekt an den spontan schlagenden Zellen. Dabei sind Konzentrationen $\geq 1 \times 10^{-11}$ M (-)-Isoproterenol und $\geq 3 \times 10^{-10}$ M (-)-Noradrenalin wirksam.

Die durch Katecholamine induzierten Wirkungen setzen sehr schnell ein und erreichen bei allen getesteten Konzentrationen spätestens nach 2 Minuten einen Gleichgewichtswert. Eine halbmaximale Wirkung ist bei Inkubation der Zellen in 1×10^{-9} M (-)-Isoproterenol nach $t_{1/2} = 23.5 \pm 1.8$ sec (n=6) erreicht (Abb. 24). Bei Inkubation in 1×10^{-8} M (-)-Isoproterenol ist die maximale Wirkung schon nach 28 sec erreicht (Abb. 25). Die Zeit bis zum Einsetzen der halbmaximalen Wirkung kann in diesem Fall nicht bestimmt werden, da mindestens 15 sec benötigt werden, um das Katecholamin mit dem Medium zu vermischen.

Die Zunahme der Schlagfrequenz, die durch (-)-Isoproterenol induziert wird, ist bei Zellen, die mit relativ niedriger Grundfrequenz schlagen, größer als bei Zellen mit hoher Grundfrequenz (Abb. 9). Deshalb wurden für quantitative Versuche über die durch Katecholamine verursachten Änderungen der Spontanfrequenz kultivierter Herzzellen vorwiegend langsam schlagende Zellen verwendet.

In den Abbildungen 11 und 12 ist der Einfluß unterschiedlicher Katecholaminkonzentrationen auf die Frequenz spontan schlagender kultivierter Herzzellen dargestellt. Die EC_{50} wurde anhand vollständiger Dosis-Wirkungskurven von 6 Einzelversuchen ermittelt und beträgt $2.3 \pm 1.6 \times 10^{-10}$ M (-)-Isoproterenol.

3.2.1.2 Positiv chronotroper Effekt von (-)-Dichloroisoproterenol (DCI) an kultivierten Rattenherzzellen

Konzentrationen von 6×10^{-10} M (-)-DCI und höher verursachen positiv chronotrope Effekte an kultivierten Rattenherzzellen. Die Zunahme der Frequenz, die durch die Substanz induziert wird, ist bei niederen Grundfrequenzen größer als bei höheren Frequenzen (Abb. 10). Eine halbmaximale frequenzsteigernde Wirkung wird nach Inkubation der kultivierten Rattenherzzellen in 2×10^{-8} M (-)-DCI nach $t_{1/2} = 35.8 \pm 8.9$ sec ($n=6$) erreicht (Abb. 33). Nach Inkubation der Zellen in 1×10^{-6} M (-)-DCI beträgt die $t_{1/2} = 15.6 \pm 3.0$ sec ($n=6$) (Abb. 34). Eine Gleichgewichtswirkung ist bei allen Konzentrationen spätestens nach 4 min erreicht. In Abb. 11 und 12 ist die Dosis-Wirkungskurve des durch (-)-DCI hervorgerufenen positiven chronotropen Effektes wiedergegeben. Die Konzentration, bei der 50% des maximalen Effekts erhalten wird, wurde aus Einzelversuchen errechnet. Sie beträgt $EC_{50} = 1.5 \pm 1.5 \times 10^{-8}$ M (-)-DCI ($n=5$).

Eine maximale Frequenzzunahme wird durch Inkubation der Zellen in 2×10^{-7} M (-)-DCI erreicht. In der folgenden Tabelle IV sind Versuche zusammengefaßt, in denen die "intrinsic activity" der positiv chronotropen Wirkung von (-)-DCI an kultivierten Rattenherzzellen bestimmt wurde.

Tabelle IV: Bestimmung der "intrinsic activity" (α) des positiv chronotropen Effekts von (-)-DCI

(α = maximale Frequenzzunahme durch (-)-DCI
pro maximale Frequenzzunahme durch (-)-Isoproterenol)

Bestimmungsverfahren 1:

Bestimmung einer Dosis-Wirkungskurve des durch (-)-DCI hervorgerufenen positiv chronotropen Effekts. Nach Erreichen des Maximums wird eine Konzentration (-)-Isoproterenol zugefügt, von der bekannt ist, daß sie einen maximalen Effekt hervorruft (dabei wurde berücksichtigt, daß (-)-Isoproterenol in Gegenwart von (-)-DCI erst bei höheren Katecholamin-konzentrationen maximale Wirkungen induziert).

Vers. aus Abb.	Grund- frequenz Schläge pro min	(-)-DCI (M)	Frequenz Schläge pro min	+(-)-Isopr. (M)	Frequenz Schläge pro min	intrinsic activity (α)
19	97	2×10^{-7}	124	2×10^{-6}	139	0.64
		6×10^{-7}	106			
	56	2×10^{-7}	137	1×10^{-6}	159	0.83
		4×10^{-7}	142			
	102	1×10^{-7}	114	2×10^{-7}	152	a)
	175	6×10^{-7}	195			
	94	2×10^{-6}	195	1×10^{-6}	225	0.40
		2×10^{-7}	108			
		2×10^{-7}	95			
		2×10^{-7}	139			
20	114	2×10^{-7}	139	3×10^{-8}	158	0.57

Fortsetzung S. 47

Tabelle IV (Fortsetzung):

Bestimmungsverfahren 2:

Bestimmung einer Dosis-Wirkungskurve des positiv chronotropen Effekts von (-)-Isoproterenol, Auswaschen der Substanz, anschließend Bestimmung einer Dosis-Wirkungskurve des positiv chronotropen Effekts von (-)-DCI an der gleichen Zelle.

Vers. aus Abb.	Grundfrequ. Schl./min	(-)-Isopr. (M)	Frequ. Schläge/min	Grundfrequ. Schl./min	(-)-DCI (M)	Frequ. Schl./min	Intrinsic activity (α)
21	42	2×10^{-8}	110	43	2×10^{-7}	63	0.34
	103	2×10^{-9}	131	103	1×10^{-7}	112	a)
	77	2×10^{-7}	142	83	1×10^{-7}	90	a)
19	101	4×10^{-9}	134	94	2×10^{-7}	108	0.42
20	86	4×10^{-8}	122	72	2×10^{-7}	95	0.64
	97	2×10^{-8}	164	114	3×10^{-8}	158	0.66

a): α wurde nicht berechnet, da bei den entsprechenden Konzentrationen keine maximalen Frequenzzunahmen zu erwarten sind.

Da sich die "intrinsic activities" von (-)-DCI, die für beide Versuchsgruppen berechnet wurden, nicht signifikant unterscheiden, fassen wir die Ergebnisse zusammen. Demnach ist die intrinsic activity des von (-)-DCI an kultivierten Rattenherzzellen induzierten positiv chronotropen Effekts

$\alpha = 0.57 \pm 0.05$ ($n=9$) (bezogen auf den chronotropen Effekt von (-)-Isoproterenol).

Beim Vergleich der Dosis-Wirkungskurven der Frequenzänderung (Abb. 11 und 12) ist ebenfalls eine größere maximale Wirkung bei Zugabe von (-)-Isoproterenol gegenüber der Zugabe von (-)-DCI zu erkennen.

3.2.1.3 Positiv chronotroper Effekt von 3',4'-Dihydroxy- β -Methylpropiofenon (U-0521) an kultivierten Rattenherzzellen

U-0521 wird als Hemmer der Catechol-O-Methyl-Transferase (COMT) verwendet (GILES und MILLER, 1967a, 1967b). Die COMT wandelt Katecholamine nach extraneuronaler Aufnahme in ein am β -Adrenoceptor kaum wirksames Derivat um (AXELROD, 1966). Wir wollten durch Hemmung dieses Enzyms mit U-0521 Aufschlüsse darüber erhalten, inwieweit sich ein Abbau von Katecholaminen auf die Sensibilität der Zellen für Katecholamine und auf die Bestimmung von Gleichgewichtsdissoziationskonstanten für einen β -Adrenoceptor-Hemmer-Komplex auswirkt. Wir stellten dabei jedoch fest, daß U-0521 selbst die Frequenz von spontan schlagenden Zellen konzentrationsabhängig bis zu einer Konzentration von 2×10^{-4} M U-0521, erhöht. Höhere Konzentrationen als 2×10^{-4} M U-0521 verursachen fortschreitend einen Frequenzzrückgang (Abb. 11 und 12).

Inkubation der Zellen in 4 mM U-0521 führten zum sofortigen Stillstand der Zellen und zum Zelltod. Abbildung 11 und 12 stellen die Konzentrationsabhängigkeit des durch U-0521 hervorgerufenen chronotropen Effekts dar. Eine halbmaximale frequenzsteigernde Wirkung wird bei ungefähr 2×10^{-5} M U-0521 erreicht. Die maximale Frequenzzunahme, die von U-0521 bewirkt wird, ist immer geringer als diejenige, die an derselben Zelle durch (-)-Isoproterenol induziert wird. In der folgenden Tabelle V sind Experimente zusammengefaßt, bei denen nach Erreichen maximaler positiv chronotroper Effekte durch Inkubation der Zellen in U-0521 eine anschließende Zugabe von maximal wirksamen Konzentrationen (-)-Isoproterenol die Spontanfrequenz erhöhte.

Tabelle V: Intrinsic activity der positiv chronotropen
Wirkung von U-0521

Grund- frequenz Schläge pro min	U-0521 (M)	Frequenz Schläge pro min	+(-)-Isopr. (M)	Frequenz Schläge pro min	intrinsic activity (a)
76	6×10^{-5}	100			
	1×10^{-4}	97	2×10^{-7}	125	0.49
83	2×10^{-4}	129	2×10^{-8}	197	0.40
13	2×10^{-4}	58	2×10^{-8}	74	0.74

Der Unterschied der positiv chronotropen Effekte, die durch (-)-Isoproterenol und U-0521 hervorgerufen werden, wird ebenfalls beim Vergleich der Dosis-Wirkungskurven (Abb. 11 und 12) deutlich. Eine halbmaximale frequenzsteigernde Wirkung von 10^{-4} M U-0521 ist nach $t_{1/2} = 37 \pm 3.3$ sec (n=6) erreicht (Abb. 39).

3.2.2.1 Antagonismus der positiv chronotropen Effekte von (-)-Isoproterenol, (-)-Noradrenalin, (-)-Dichloro- isoproterenol (DCI) und 3',4'-Dihydroxy- β -methyl- propiofenon (U-0521) mit (-)-Bupranolol an kultiv- ierten Rattenherzzellen

Um festzustellen, ob die von den untersuchten Substanzen hervorgerufenen positiv chronotropen Effekte über den β -Adrenoceptor vermittelt werden, versuchten wir, durch Inkubation der Zellen mit dem β -Adrenoceptorblocker (-)-Bupranolol das Auftreten der Effekte zu hemmen. Konzentrationen bis zu 2×10^{-6} M (-)-Bupranolol zeigten weder depressive noch stimulierende Wirkungen auf die Schlagfrequenz von kultivierten

Rattenherzzellen, hemmten aber die positiv chronotropen Effekte der untersuchten Substanzen. Die Hemmung kann jedoch durch höhere Konzentrationen des Agonisten durchbrochen werden.

Dosis-Wirkungskurven des positiv chronotropen Effekts der oben beschriebenen Agonisten bzw. partiellen Agonisten werden in Gegenwart des β -Adrenoceptorblockers (-)-Bupranolol zu höheren Konzentrationsbereichen verschoben und laufen gegenüber der Dosis-Wirkungskurve, die in Abwesenheit des Hemmers bestimmt wurde, annähernd parallel (Abb. 13, 14, 16, 18).

Mit der konventionellen Rezeptortheorie (ARUNLAKSHANA und SCHILD, 1959; siehe Seite 15) wurde untersucht, inwieweit sich die Hemmung kompetitiv verhielt. Wird der $\log$. (KQ-1) gegen den $-\log B$ aufgetragen, so erwartet man für einen simplen kompetitiven Antagonismus theoretisch eine Gerade mit der Steigung 1. Dabei ergibt nach ARUNLAKSHANA und SCHILD (1959) der Schnittpunkt mit der Abszisse die Dissoziationskonstante von (-)-Bupranolol und dem β -Adrenoceptor.

Tabelle VI: Steigungen der Regressionsgeraden ermittelt anhand der doppellogarithmischen Auftragung der hemmenden Wirkung von (-)-Bupranolol (ARUNLAKSHANA und SCHILD, 1959; siehe Einleitung und Tabelle XVI).

Versuch Abb.	Steigung der Regressionsgeraden	Agonist	Konzentrationsbereich (-)-Bupranolol M
13 a)	1.01	(-)-Isoproterenol	1×10^{-9} - 2×10^{-6}
14 a)	0.89	(-)-Isoproterenol	2×10^{-9} - 1×10^{-6}
15 b)	0.96	(-)-Isoproterenol	1×10^{-9} - 2×10^{-6}
16 a)	0.94	(-)-DCI	2×10^{-9} - 4×10^{-8}
17 b)	0.95	(-)-DCI	1×10^{-9} - 4×10^{-8}

- a) Versuch an einer Einzelzelle
- b) Zusammenfassung aller Versuche mit dem entsprechenden Agonisten der Tabelle XVI.

Da die oben bestimmten Neigungen der Regressionsgeraden auf einen kompetitiven Antagonismus zwischen (-)-Bupranolol und (-)-Isoproterenol bzw. (-)-DCI hinweisen, können apparente Dissoziationskonstanten für den (-)-Bupranolol-Rezeptor-komplex ermittelt werden (Tabelle XVI).

Die Hemmung des positiv chronotropen Effekts von U-0521 konnte nur in Gegenwart einer Konzentration von (-)-Bupranolol untersucht werden (Abb. 18). Verwendet man höhere Konzentrationen (-)-Bupranolol, so müssen, um die Hemmung zu durchbrechen, Konzentrationen U-0521 eingesetzt werden, die zusätzlich einen negativ chronotropen Effekt induzieren. Die Konzentrationsquotienten, die für den Antagonismus zwischen U-0521 und 2×10^{-9} M (-)-Bupranolol berechnet wurden, sind von der gleichen Größenordnung wie diejenigen, die für den Antagonismus zwischen (-)-Isoproterenol (Abb. 15) bzw. (-)-DCI (Abb. 17) und der gleichen Konzentration (-)-Bupranolol ermittelt wurden (Tabelle XVI).

Der positiv chronotrope Effekt von (-)-Noradrenalin wird von (-)-Bupranolol auf ähnliche Weise gehemmt wie die Effekte von (-)-Isoproterenol. Der errechnete Konzentrationsquotient des Versuchs aus Abbildung 18 ist von der Größenordnung, die man auch bei der Hemmung des Effekts von (-)-Isoproterenol durch die gleiche Konzentration (-)-Bupranolol erwarten würde (vergleiche Werte von Tabelle XVI und Abb. 18).

3.2.2.2 Positiv chronotroper Effekt von (-)-Isoproterenol an kultivierten Katzenherzzellen, Hemmung durch (-)-Bupranolol

Katzenherzzellen zeigten eine ähnliche Empfindlichkeit für Katecholamine wie Rattenherzzellen. Der durch (-)-Isoproterenol induzierte positiv chronotrope Effekt wird von (-)-Bupranolol gehemmt. Die Hemmung kann durch höhere Konzentrationen des Katecholamins durchbrochen werden. Der in Tabelle XVI berechnete Konzentrationsquotient gleicher Effekte (-)-Isoproterenol in Gegenwart 1×10^{-7} M (-)-Bupranolol zu Abwesenheit des Hemmers weist darauf hin, daß der positiv chronotrope Effekt von (-)-Isoproterenol bei Katzenherzzellen wie bei Rattenherzzellen durch (-)-Bupranolol auf die gleiche Weise gehemmt wird.

3.2.2.3 Unempfindlichkeit von kultivierten embryonalen Hühnerherzzellen auf Zugabe von (-)-Isoproterenol

Nicht alle Autoren konnten an kultivierten Herzzellen embryonaler Hühnchen eine positiv chronotrope Wirkung von Katecholaminen nachweisen (KAUFMANN und Mitarbeiter, 1969; SPERELAKIS, 1972). Deshalb interessierte uns, gerade weil wir an Ratten- und Katzenherzzellen intakte β -Adrenoceptoren nachgewiesen hatten, ob unter unseren Versuchsbedingungen kultivierte Hühnerherzzellen nach Zugabe von (-)-Isoproterenol eine positiv chronotrope Reaktion zeigten.

20 Kulturen von unterschiedlichem Alter (1-8 Tage) wurden mit steigenden Konzentrationen (-)-Isoproterenol inkubiert und deren chronotropes Verhalten registriert. Innerhalb eines Konzentrationsbereiches von 1×10^{-11} M bis 4×10^{-6} M (-)-Isoproterenol konnte keine eindeutige Konzentrationsabhängigkeit einer durch das Katechol induzierten Frequenzzunahme festge-

stellt werden. Dieses Verhalten muß nicht unbedingt auf eine Unempfindlichkeit der Zellen für Katecholamine zurückgeführt werden. Da die Grundfrequenz der kultivierten Hühnerherzzellen, im Gegensatz zu den Ratten- und Katzenherzzellen, keinen stabilen Wert behält, besteht die Möglichkeit, daß eine Zunahme der Frequenz, die durch Katecholamine induziert wird, durch eine entgegengesetzte Drift der Frequenz der Zelle verdeckt wird. Andererseits könnte eine langsame Zunahme der Spontanfrequenz der Zelle eine durch Katecholamine induzierte Zunahme der Frequenz vortäuschen.

Deshalb wurde nach Inkubation der Zellen in (-)-Isoproterenol der β -Adrenoceptorblocker (-)-Bupranolol dem Medium zugesetzt. Dabei erwarteten wir, daß der Hemmer in diesem Fall eine Frequenzsenkung bewirkt. Jedoch ergaben auch Versuche dieser Art keine eindeutigen Resultate. Nur in 5 von 20 Versuchen konnte eine Frequenzänderung beobachtet werden, die eventuell durch (-)-Isoproterenol verursacht wurde (Tabelle VII). Um genauere Aussagen über einen chronotropen Effekt von Katecholaminen an kultivierten Hühnerherzzellen machen zu können, müssen die Kultivationsbedingungen optimiert werden, um zu erreichen, daß die Zellen mit konstanter Frequenz schlagen.

KAUFMANN und Mitarbeiter (1969) führen das Ausbleiben eines positiv chronotropen Effekts von Katecholaminen an kultivierten Hühnerherzzellen auf die tryptische Schädigung des β -Adrenoceptors der Zellen zurück. Da die chronotropen Effekte an den von uns kultivierten Zellen keinen geeigneten Meßparameter darstellen, untersuchten wir, ob die durch Katecholamine induzierte Änderung des c-AMP-Gehalts der kultivierten Hühnerherzzellen Aussagen über die Anwesenheit von β -Adrenoceptoren an diesen Zellen erlaubt.

Tabelle VII: Versuche zur Bestimmung eines durch (-)-Isoproterenol induzierten positiv chronotropen Effekts an kultivierten Hühnerherzzellen

Alter in Tagen	Grund- frequenz	+(-)-Isopr. (M)	Frequenz	(-)-Bupr. (M)	Frequenz
6	81	3.3×10^{-8}	98	2×10^{-7}	76
4	55	4×10^{-6}	70	6×10^{-6}	47
3	16	3×10^{-10}	25	2×10^{-7}	15
2	59	1×10^{-7}	73	1×10^{-7}	68
2	48	1.2×10^{-9}	61		

3.2.3 Antagonismus zwischen (-)-DCI und (-)-Isoproterenol: Berechnung der fraktionellen Rezeptorbesetzungskurve und der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten für den (-)-DCI-Rezeptorkomplex

Als typischer partieller Agonist induziert (-)-DCI einen positiv chronotropen Effekt, indem es viele β -Adrenoceptoren besetzt (KAUMANN, 1973; KAUMANN und Mitarbeiter, 1977b). Aus diesem Grunde hemmt es gleichzeitig durch (-)-Isoproterenol hervorgerufene Effekte.

In den folgenden 2 Versuchen soll die β -Adrenoceptor-blockierende Eigenschaft von (-)-DCI demonstriert werden. Zellen mit der Grundfrequenz von 59 bzw. 52 Schlägen/Minute erhöhten in Gegenwart von 2×10^{-8} M (-)-Isoproterenol ihre Frequenz auf 131 bzw. 129 Schläge/Minute. Eine darauffolgende Zugabe von 2×10^{-7} M (-)-DCI senkte die Frequenzen beider Zellen auf 102 Schläge/Minute. Die Ausgangsfrequenz wird nicht wieder erreicht, da (-)-DCI bei dieser Konzentration eine stark stimulierende Wirkung ausübt.

Wie in der Einleitung beschrieben, kann man für den partiellen Agonisten die fraktionelle Rezeptorbesetzung y_{DCI} der β -Adrenoceptoren durch den Liganden und die Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_{DCI} für den (-)-DCI-Rezeptorkomplex bestimmen. Es kann somit Aufschluß darüber erlangt werden, wie groß der Anteil der Rezeptoren ist, die für eine definierte Wirkung von (-)-DCI verantwortlich sind.

In Abbildung 19 und 20 sind die Versuchsabläufe dargestellt und beschrieben, bei denen y_{DCI} und K_{DCI} bestimmt wurden. Die Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_{DCI} für den (-)-DCI-Rezeptorkomplex läßt sich anhand der fraktionellen Rezeptorbesetzung y_{DCI} nach Gleichung (24) berechnen:

$$K_{DCI} = ([DCI]/y_{DCI}) - [DCI]$$

In der folgenden Tabelle sind die in Einzelversuchen ermittelten Werte für y_{DCI} und K_{DCI} zusammengefaßt.

Tabelle VIII: Fraktionelle Rezeptorbesetzung y_{DCI} der β -Adrenoceptoren durch eine chronotrop maximal wirksame Konzentration (-)-DCI und Berechnung der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten des (-)-DCI- β -Adrenoceptorkomplexes

Die Bestimmung der fraktionellen Rezeptorbesetzung wurde nach 2 Methoden durchgeführt:

- a) KAUMANN, 1973 (Gleichung (25))
- b) MARANO und KAUMANN, 1976; KAUMANN und MARANO, 1973 (Gleichung (23) und (24)).

Versuch Abb.	Methode	(-)-DCI (M)	y_{DCI}	K_{DCI} (M)	$-\log K_{DCI}$
19	a)	2×10^{-7}	0.92	1.55×10^{-8}	7.80
	a)	2×10^{-7}	0.90	2.34×10^{-8}	7.63
	b)	2×10^{-7}	0.94	1.23×10^{-8}	7.91
20	b)	2×10^{-7}	0.87	3.09×10^{-8}	7.51
21	a)	1×10^{-7}	0.82	2.22×10^{-8}	7.65

Mittelwert: 7.68

Aus den Ergebnissen der Tabelle läßt sich als Mittelwert eine Gleichgewichtsdissoziationskonstante $K_{DCI} = 2 \pm 1.2 \times 10^{-8} M$ (-)-DCI (n=5) für den (-)-DCI- β -Adrenozeptorkomplex berechnen.

In Abbildung 35 und 36 ist die fraktionelle Rezeptorbesetzungskurve der β -Adrenoceptoren durch (-)-DCI, die mit Hilfe der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten errechnet wurde, und die Dosis-Wirkungskurve des durch (-)-DCI hervorgerufenen positiv chronotropen Effekts eingezeichnet. Die maximale chronotrope Wirkung ist dabei als Maß für 100% Rezeptorbesetzung gesetzt worden. Beide Kurven zeigen die gleiche Konzentrationsabhängigkeit. Das gleiche Ergebnis, nämlich gleicher Verlauf von Dosis-Wirkungskurve und der normierten Rezeptorbesetzungskurve, wurde auch bei dem Versuch an einer Einzelzelle (Abb. 19) gefunden.

3.3 UNTERSUCHUNG DES EFFEKTS VON β -ADRENOCEPTORLIGANDEN AUF DEN ZELLULÄREN cAMP-GEHALT

3.3.1 Einfluß der Kulturbedingungen auf den cAMP-Gehalt der kultivierten Ratten- und Hühnerherzzellen

Einflüsse von (-)-Isoproterenol auf den cAMP-Gehalt von kultivierten Herzzellen wurden an Ratten- und Hühnerherzzellen, Einflüsse von (-)-DCI und U-0521 nur an Rattenherzzellen untersucht. In diesem Zusammenhang führten wir Versuche an 5-7 Tage alten Rattenherzzellkulturen und an 2-7 Tage alten Hühnerherzzellkulturen durch. Die Zellzahl der untersuchten Kulturen betrug zwischen 7×10^5 und 5.6×10^6 Zellen/Kultur.

Untersuchungen an anderen Zellsystemen zeigten, daß sich sowohl die Zellzahl als auch das Alter einer Kultur auf den cAMP-Gehalt der Zellen auswirkt (CHLAPOWSKI und Mitarbeiter, 1975). Es bleibt zu klären, ob diese Parameter ebenfalls den cAMP-Gehalt kultivierter Herzzellen beeinflussen.

In den Abbildungen 22 und 23 ist der cAMP-Gehalt von Rattenherzzellkulturen sowie von Hühnerherzzellkulturen in Abhängigkeit zur Zellzahl/Kulturgefäß aufgetragen. Es wird deutlich, daß zumindest bei kultivierten Rattenherzzellen der cAMP-Gehalt der Zellen bei geringer Zellzahl/Kultur größer ist, als derjenige, der in Kulturen mit größerer Zellzahl/Kulturgefäß bestimmt wurde.

Es fällt auf, daß die Werte, die für den cAMP-Gehalt von Hühnerzellen ermittelt wurden, stärker streuen verglichen mit den Werten, die an Rattenzellen gewonnen wurden. Ein Grund dafür kann einerseits darin zu finden sein, daß sich jede Zellcharge bezüglich ihres cAMP-Gehalts individuell verhält; andererseits sind bei Hühnerzellen die Unterschiede des cAMP-Gehalts schon zwischen parallel angesetzten Kulturen stärker ausgeprägt als bei Rattenzellen.

Untersuchungen über Einflüsse des Alters einer Kultur auf den cAMP-Gehalt der Zellen werden durch folgende kultivationsbedingte Fakten erschwert: es hat sich als günstig erwiesen, Zellen aus einem Kulturansatz zu verwenden, um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten. Die Zellzahl der Kulturen nimmt aber mit fortschreitendem Alter zu und beeinflusst somit wiederum das Versuchsergebnis. Sät man dagegen die Zellen eines Versuchsansatzes in unterschiedlicher Zelldichte aus, um an verschiedenen Tagen Kulturen mit gleicher Zellzahl zu erhalten, sind die Kulturen wegen der unterschiedlichen Kultivationsbedingungen (verschiedene Anteile von fibroblastenähnlichen Zellen in den einzelnen Kulturen) nicht mehr vergleichbar.

Die folgende Tabelle IX soll einen groben Anhaltspunkt über den Einfluß des Alters der Kulturen in dem von uns vorwiegend zu Versuchen verwendeten Zeitraum auf den zellulären cAMP-Gehalt der Zellen geben. Es wurden hierzu Kulturen verschiedener Chargen verwendet, deren Zellzahl/Kultur zwischen 1×10^6 und 4×10^6 Zellen lag.

Tabelle IX: cAMP-Gehalt der kultivierten Ratten- (R) und Hühnerzellen (H) in Abhängigkeit vom Alter der Kultur und den Kultivationsbedingungen

Tierart	Alter (Tage)	cAMP-Gehalt/ mg Zellprotein (pMole)	cAMP-Gehalt/ Zelle (10^{-18} Mole)	Pferdeserum
R	5	24 ± 2.8 (4)	6.2 ± 1.6 (4)	+
R	6	29 ± 3.8 (6)	5.9 ± 1.1 (6)	-
R	7	25 ± 1.8 (4)	3.4 ± 0.6 (4)	+
R	7	29 ± 3.2 (6)	7.6 ± 1.3 (6)	-
H	3	26 ± 6.5 (3)	4.7 ± 1.1 (3)	+
H	5	25 ± 3.7 (10)	3.8 ± 0.8 (4)	+
H	7	29 ± 6.8 (5)	7.1 ± 0.9 (3)	+

Das Alter der Kultur scheint, wenigstens in dem von uns zu Versuchen verwendeten Zeitraum, wenig Einfluß auf den cAMP-Gehalt der kultivierten Zellen zu haben. Der cAMP-Gehalt von Zellen, die vor Versuchsbeginn mit frischem, serumfreien Medium versorgt wurden, unterscheidet sich nicht von demjenigen, der in Zellen bestimmt wurde, die vor Versuchsbeginn mit serumhaltigem Medium inkubiert wurden (vergleiche auch Abb. 22).

Für die Untersuchungen über den Einfluß der β -Adrenoceptor-liganden auf den cAMP-Gehalt der Zellen ergeben sich folgende Konsequenzen:

- Wir verwenden bei vergleichenden Untersuchungen Zellen eines Kultivationsansatzes.
- Um einem etwaigen Einfluß des Kultivationsalters zu begegnen, bevorzugen wir für Versuche vorwiegend 5 Tage alte Kulturen.
- Die Zellzahl/Kulturgefäß soll bei vergleichenden Versuchen ähnlich sein.
- Da die Werte des cAMP-Gehalts von zell dichteren Kulturen weniger streuen als diejenigen, die für Kulturen mit wenigen

Zellen bestimmt wurden, verwenden wir vorwiegend zellreiche Kulturen für unsere Untersuchungen.

3.3.2 Effekt von (-)-Isoproterenol auf den cAMP-Gehalt kultivierter Rattenherzzellen

3.3.2.1 Kinetik der Katecholaminwirkung

Um festzustellen, ob (-)-Isoproterenol den cAMP-Gehalt kultivierter Rattenherzzellen beeinflusst, werden Zellkulturen der gleichen Charge unterschiedliche Zeiten lang (0.5 bis 10 Minuten) mit dem Katecholamin inkubiert. 10^{-9} M und 10^{-8} M (-)-Isoproterenol erhöhen den zellulären cAMP-Gehalt innerhalb der ersten Minute. Im weiteren Zeitverlauf nimmt der cAMP-Gehalt der Zellen in Gegenwart dieser Katecholaminkonzentration wieder ab (Abb. 24, 25, 26). Nach Inkubation in 10^{-5} M (-)-Isoproterenol nimmt der cAMP-Gehalt der kultivierten Zellen innerhalb der ersten Minute zu und ändert sich nicht mehr signifikant bis zu 5 Minuten Inkubationszeit (Abb. 26).

1×10^{-10} M sowie 4×10^{-10} M (-)-Isoproterenol, Konzentrationen die chronotrope Effekte hervorrufen (Abb. 11, 12), induzieren jedoch nach einer Minute Inkubation keine signifikante Zunahme des zellulären cAMP-Gehalts. cAMP wird durch das Enzym Phosphodiesterase in AMP umgewandelt (BUTCHER und SUTHERLAND, 1962). Eine hohe Aktivität dieses Enzyms könnte einer durch 1×10^{-10} M (-)-Isoproterenol induzierten Zunahme des zellulären cAMP-Gehalts entgegenwirken. Deshalb untersuchten wir, ob nach Hemmung der Phosphodiesterase mit 1 mM 3-Isobutyl-1-Methylxanthin (MIX) eine Zunahme des cAMP-Gehalts durch niedrige Konzentrationen (-)-Isoproterenol (1×10^{-10} M) messbar ist.

Wirkung von 3-Isobutyl-1-Methylxanthin (MIX) auf den cAMP Gehalt von Rattenherzzellkulturen

1 mM MIX erhöht den zellulären cAMP-Gehalt kultivierter Rattenherzzellkulturen. 15-25 Minuten nach Zugabe der Substanz hat sich ein annähernd konstanter cAMP-Gehalt eingestellt (Abb. 27). Wir nehmen an, daß sich während dieses Zeitraumes ein neuer Gleichgewichtszustand der zellulären cAMP-Konzentration ausgebildet hat. Deshalb wurden bei Versuchen, in denen der Einfluß von Substanzen auf den zellulären cAMP-Gehalt von gezüchteten Zellen in Gegenwart des Phosphodiesterasehemmers MIX untersucht werden sollte, die Zellkulturen vor Zugabe der Testsubstanzen 15 Minuten lang mit 1 mM MIX präinkubiert.

In Gegenwart des Phosphodiesterasehemmers erhöht 1×10^{-10} M (-)-Isoproterenol nach einer Minute Inkubation den cAMP-Gehalt der kultivierten Rattenherzzellen signifikant gegenüber der Kontrolle (15 Minuten Präinkubation in 1 mM MIX + 1 Minute $0.4 \mu\text{M}$ EDTA). In der folgenden Tabelle X ist der zelluläre cAMP-Gehalt der kultivierten Rattenherzzellen in Gegenwart und Abwesenheit des Phosphodiesterasehemmers, nach Inkubation der Zellen in 1×10^{-10} M (-)-Isoproterenol verglichen.

Tabelle X: Zellulärer cAMP-Gehalt von kultivierten Rattenherzzellen nach 1 und 5 Minuten Inkubation in 1×10^{-10} M und 4×10^{-10} M (-)-Isoproterenol

Bedingung	cAMP-Gehalt der Zellen/mg Zellprotein (pMole)			t-Test
	Kontrolle $0.4 \mu\text{M}$ EDTA	1×10^{-10} M (-)-Isoproterenol	4×10^{-10} M (-)-Isoproterenol	
		1 min	1 min	
	6.8 ± 1.0 (3) 8.6 ± 1.1 (4)	8.1 ± 1.5 (4)	7.1 ± 1.4 (4)	
15 min 1 mM MIX		1 min		$p < 0.005$
	67 ± 5.1 (6)	99 ± 5.5 (4)		
		5 min		
	65 ± 5.3 (7)	82 ± 12.5 (4)		

5 Minuten Inkubation in 1×10^{-10} M (-)-Isoproterenol nach 15 Minuten Präinkubation der Zellen in 1 mM MIX zeigt keine signifikante Zunahme des zellulären cAMP-Gehalts. Bestimmt man die Zunahme des cAMP-Gehalts der kultivierten Rattenherzzellen zu verschiedenen Zeiten nach Zugabe von 1×10^{-8} M (-)-Isoproterenol, erhält man den gleichen Zeitverlauf unabhängig davon, ob die Zellen mit 1 mM MIX präinkubiert wurden oder nicht (Abb. 25 und 26). Allerdings ist die durch das Katecholamin verursachte Zunahme in Gegenwart von MIX 16-20 mal stärker verglichen mit derjenigen, die in den Kulturen, die nicht mit dem Phosphodiesterasehemmer vorbehandelt waren, bestimmt wurde (Abb. 25).

Demgegenüber unterscheidet sich der Zeitverlauf der Zunahme des cAMP-Gehalts in Gegenwart und Abwesenheit des Phosphodiesterasehemmers nach Inkubation der Zellen in 1×10^{-5} M (-)-Isoproterenol (Abb. 26). Während die Zellen, in denen die Phosphodiesterase nicht gehemmt wurde, nach einer Minute Inkubation in 1×10^{-5} M (-)-Isoproterenol keine signifikante Änderung des cAMP-Gehaltes mehr zeigen, nimmt der zelluläre Gehalt des cyclischen Nukleotids in Gegenwart von 1 mM MIX während 5 Minuten beständig zu.

3.3.2.2 Dosis-Wirkungskurven der durch (-)-Isoproterenol induzierten Änderung des cAMP-Gehalts kultivierter Rattenherzzellen

(-)-Isoproterenol erhöht den zellulären cAMP-Gehalt kultivierter Rattenherzzellen sowohl in Gegenwart als auch in Abwesenheit des Phosphodiesterasehemmers 3-Isobutyl-1-Methylxanthin (MIX) (15 Minuten Präinkubation der Zellen in 1 mM MIX) dosisabhängig (Abb. 26). Da jedoch an den Kinetiken der Änderung des cAMP-Gehalts der Zellen keine Gleichgewichtswerte bestimmt werden können, bereitet es Schwierigkeiten, eine relevante Dosis-

Wirkungskurve der durch (-)-Isoproterenol bewirkten Änderung des zellulären cAMP-Gehalts aufzustellen, die mit der Gleichgewichts-Dosis-Wirkungskurve des durch (-)-Isoproterenol hervorgerufenen positiv chronotropen Effekts verglichen werden kann. Deutlich wird der Unterschied der Kinetiken in Abb. 24 und 25. Während die durch 1×10^{-9} M und 1×10^{-8} M (-)-Isoproterenol induzierten positiv chronotropen Effekte in der Form einer Sättigungskinetik einsetzen, zeigt die Zeitabhängigkeit der durch die gleichen Konzentrationen des Katecholamins bewirkten Änderung des zellulären cAMP-Gehalts einen transitorischen Verlauf.

Um überhaupt eine Dosis-Wirkungskurve für die durch das Katecholamin stimulierte Zunahme des cAMP-Gehalts bestimmen zu können, wählten wir deshalb willkürlich eine Inkubationszeit von einer Minute in (-)-Isoproterenol. Diese Inkubationszeit erscheint uns geeignet, da zu diesem Zeitpunkt bei allen untersuchten Konzentrationen (-)-Isoproterenol sowohl eine maximale Frequenzzunahme als auch eine maximale Zunahme des zellulären cAMP-Gehalts erreicht ist. In drei unabhängigen Versuchsreihen an jeweils einer Zellcharge wurde die Dosis-Abhängigkeit der Änderung des cAMP-Gehalts von kultivierten Rattenherzzellen nach einer Minute Inkubation in (-)-Isoproterenol bestimmt (Abb. 28, linke Seite). Die aus diesen Einzelversuchen berechnete EC_{50} beträgt $4.9 \pm 1.8 \times 10^{-9}$ M (-)-Isoproterenol. Abbildung 28 (rechte Seite) faßt die Ergebnisse der drei Versuche in einer Dosis-Wirkungskurve (in % Zunahme ausgehend vom Grundgehalt der Kontrollen) zusammen.

Diese Dosis-Wirkungskurve der durch 1 Minute Inkubation in (-)-Isoproterenol bewirkten Änderung des cAMP-Gehalts (EC_{50} $4.9 \pm 1.8 \times 10^{-9}$ M; Abb. 28) liegt gegenüber der Dosis-Wirkungskurve des positiv chronotropen Effekts (EC_{50} $2.3 \pm 1.6 \times 10^{-10}$ M; Abb. 11 und 12) bei höheren Katecholaminkonzentrationen.

Wir haben bereits gezeigt, daß niedrige Konzentrationen (-)-Isoproterenol (1×10^{-10} M) nur in Gegenwart des Phosphodiesterasehemmers MIX den cAMP-Gehalt der kultivierten Rattenherzzellen meßbar beeinflussen. Wir stellten uns nun die Frage: Nähert sich die Dosis-Wirkungskurve der durch (-)-Isoproterenol induzierten Änderung des cAMP-Gehalts der Dosis-Wirkungskurve des positiv chronotropen Effekts des Katecholamins an, wenn man die Phosphodiesterase mit MIX blockiert?

Ein Versuch an einer Zellcharge (Abb. 29) demonstriert die Dosis-Abhängigkeit der Änderung des zellulären cAMP-Gehalts kultivierter Pattenherzzellen nach Zugabe verschiedener Konzentrationen (-)-Isoproterenol nach 15 Minuten Präinkubation der Zellen in 1 mM MIX. Die Dosis-Wirkungskurven der Änderung des cAMP-Gehalts der Zellen und der positiv chronotropen Wirkung nähern sich nicht an (Abb. 29). Vielmehr zeigt die Dosis-Wirkungskurve der Änderung des zellulären cAMP-Gehalts, die in Gegenwart des Phosphodiesterasehemmers bestimmt wurde, die gleiche Konzentrationsabhängigkeit wie diejenigen, die ohne Beeinflussung der Phosphodiesterase ermittelt wurden.

3.3.2.3 Hemmung des den cAMP-Gehalt kultivierter Rattenherzzellen beeinflussenden Effekts von (-)-Isoproterenol durch (-)-Bupranolol

Um zu klären, ob die durch (-)-Isoproterenol induzierte Zunahme des zellulären cAMP-Gehalts durch β -Adrenoceptoren vermittelt wird, versuchten wir diese von dem Katecholamin induzierte Zunahme durch Präinkubation der Zellen mit dem β -Adrenoceptorblocker (-)-Bupranolol zu hemmen. Hierfür wurden Zellkulturen mit 2×10^{-9} M und 1×10^{-8} M (-)-Bupranolol 25-30 Minuten präinkubiert und anschließend 1 Minute mit verschiedenen Konzentrationen (-)-Isoproterenol versetzt.

Die durch (-)-Isoproterenol induzierte Zunahme des zellulären cAMP-Gehalts wird in Gegenwart von (-)-Bupranolol gehemmt. Die Hemmung kann von höheren (-)-Isoproterenol-Konzentrationen durchbrochen werden (Abb. 32). Konzentrationsquotienten zwischen gleichwirksamen Konzentrationen (-)-Isoproterenol in Gegenwart und Abwesenheit des Hemmers wurden ermittelt (Tabelle XVII). Diese Konzentrationsquotienten unterscheiden sich nicht von denen, die man bei kompetitiver Hemmung des von (-)-Isoproterenol induzierten positiv chronotropen Effekts durch (-)-Bupranolol für die entsprechende Hemmerkonzentration erwartet (Tabelle XVI).

3.3.3.1 Effekt von (-)-Dichloroisoproterenol (DCI) auf den cAMP-Gehalt von Rattenherzzellkulturen

Um festzustellen, ob (-)-DCI den cAMP-Gehalt kultivierter Rattenherzzellen erhöht, wurden die Zellen 1 Minute, 3 Minuten und 5 Minuten in 1×10^{-6} M (-)-DCI inkubiert. Der cAMP-Gehalt der Zellen nimmt unter diesen Versuchsbedingungen nicht signifikant zu (Tabelle XI). Jedoch erhöht 1×10^{-6} M (-)-DCI (5 Minuten Inkubation) nach Präinkubation der Zellen in 1 mM MIX (15 Minuten) den cAMP-Gehalt kultivierter Rattenherzzellen 2.6 bis 2.7fach gegenüber den Kontrollen.

Tabelle XI: Effekt von 1×10^{-6} M (-)-DCI auf den cAMP-Gehalt kultivierter Rattenherzzellen

Bedingung	Inkubationszeit (min)	cAMP-Gehalt/ mg Zellprotein (pMole)	cAMP-Gehalt/ Zelle (10^{-18} Mole)
Kontrolle 0.4 μ M EDTA	5	31.6 ± 1.8 (26)	5.6 ± 0.5 (16)
1×10^{-6} M (-)-DCI	5	28.9 ± 1.7 (14)	6.4 ± 0.4 (12)
1×10^{-6} M (-)-DCI	3	31.8 ± 2.3 (4)	
1×10^{-6} M (-)-DCI	1	30.3 ± 4.0 (4)	

Fortsetzung Tabelle XI:

Bedingung	Inkubationszeit (min)	cAMP-Gehalt/ mg Zellprotein (pMole)	cAMP-Gehalt/ Zelle (10^{-18} Mole)
15 Minuten Präinkubation der Zellen in 1 mM MIX			
Kontrolle 0.4 μ M EDTA	5	75 $\pm$ 8.6 (11)	18.3 $\pm$ 2.0 (12)
1x10 ⁻⁶ M (-)-DCI	5	197 $\pm$ 25.3 (7)	49.7 $\pm$ 13.3 (4)

Somit konnten wenigstens in Gegenwart des Phosphodiesterase-hemmers 3-Isobutyl-1-Methylxanthin (15 Minuten Präinkubation) Kinetiken der durch (-)-DCI bewirkten Änderung des cAMP-Gehalts der kultivierten Rattenherzzellen bestimmt werden.

Der cAMP-Gehalt der Zellen nimmt bei Inkubation in 2×10^{-8} M (-)-DCI in den ersten 2.5 Minuten nach Zugabe der Substanz in der Form einer Sättigungskurve zu (Abb. 33). In dem darauf folgenden Zeitraum von 2.5 Minuten bis 7.5 Minuten nach der Zugabe ändert sich der cAMP-Gehalt nicht mehr signifikant.

Nach Inkubation der Zellen in 1×10^{-6} M (-)-DCI (15 Minuten Präinkubation in 1 mM MIX) nimmt der cAMP-Gehalt der kultivierten Zellen schneller zu und erreicht höhere Konzentrationen, verglichen mit der Zunahme bei Inkubation in 2×10^{-8} M (-)-DCI (Abb. 34). 5 Minuten nach der Zugabe von 1×10^{-6} M (-)-DCI ändert sich der cAMP-Gehalt der kultivierten Zellen nicht mehr wesentlich.

Um die Zeitabhängigkeit der Zunahme des cAMP-Gehalts der Zellen mit der Kinetik der Frequenzzunahme nach Zugabe von (-)-DCI vergleichen zu können, versuchten wir, chronotrope Wirkungen von (-)-DCI in Gegenwart von MIX zu messen. Inkubation der Zellen in 1 mM MIX bewirkte jedoch arrhythmische Kontraktionen. 0.1 mM MIX erhöhte die Spontanfrequenz der kultivierten Rattenherzzellen, anschließende Zugabe von (-)-DCI führte bei so vorbehandelten Zellen wiederum zu arrhythmischen Kontraktionen.

Um wenigstens annähernd eine Vergleichsmöglichkeit zu besitzen, sind in den Abbildungen 33 und 34 die Kinetiken des durch 2×10^{-8} M und 1×10^{-6} M (-)-DCI, in Abwesenheit von MIX, hervorgerufenen positiv chronotropen Effekts mit der Kinetik der durch den partiellen Agonisten bewirkten Änderung des cAMP-Gehalts in Gegenwart von MIX verglichen. In beiden Fällen tritt die Frequenzzunahme 3-4 mal schneller ein als die Zunahme des cAMP-Gehalts.

3.3.3.2 Dosis-Wirkungskurve der durch (-)-DCI induzierten Änderung des cAMP-Gehalts kultivierter Rattenherzzellen

Da wir vermuten, daß beide durch (-)-DCI induzierten Effekte, nämlich der positiv chronotrope Effekt sowie die Zunahme des zellulären cAMP-Gehalts, durch β -Adrenoceptoren mit den gleichen Affinitätseigenschaften vermittelt werden, interessiert uns vor allem, in welcher Beziehung beide Effekte zu der fraktionellen Rezeptorbesetzungskurve der β -Adrenoceptoren durch den partiellen Agonisten stehen.

Um eine Dosis-Wirkungskurve für die durch (-)-DCI induzierte Änderung des cAMP-Gehalts zu bestimmen, wählten wir willkürlich eine Inkubationszeit von 5 Minuten in (-)-DCI (15 Minuten Präinkubation in 1 mM MIX). Nach dieser Inkubationszeit mit dem partiellen Agonisten hat sich bei den von uns untersuchten Konzentrationen ein neues Frequenzgleichgewicht eingestellt, und die Zunahme des cAMP-Gehalts nähert sich einem Sättigungswert.

In Abb. 35 ist die Abhängigkeit des cAMP-Gehalts von ansteigenden Konzentrationen (-)-DCI, die in Versuchen mit unterschiedlichen Zellchargen und nach jeweils 5 Minuten Inkubation mit dem partiellen Agonisten bestimmt wurde, aufgetragen.

Bis 2×10^{-8} M (-)-DCI zeigen die Dosis-Wirkungskurve der Zunahme des cAMP-Gehalts der kultivierten Zellen, die fraktionelle Rezeptorbesetzungskurve und die Dosis-Wirkungskurve des positiv chronotropen Effekts ungefähr den gleichen Verlauf. Bei höheren Konzentrationen (-)-DCI wird die Steigung der Kurve des cAMP-Gehalts der Zellen flacher. Ein Maximum ist bei Inkubation in 1×10^{-5} M (-)-DCI erreicht.

In Abb. 36 ist die Dosisabhängigkeit der durch (-)-DCI induzierten Zunahme des zellulären cAMP-Gehalts, die an Zellen aus einem Kultivationsansatz bestimmt wurde, mit der Dosis-Wirkungskurve des von (-)-DCI hervorgerufenen positiv chronotropen Effekts, sowie mit der fraktionellen Rezeptorbesetzungskurve der β -Adrenoceptoren durch (-)-DCI verglichen. Hier besteht eine annähernde Übereinstimmung des Verlaufs der drei Kurven.

3.3.3.3 Hemmung des den cAMP-Gehalt kultivierter Rattenherzzellen beeinflussenden Effekts von (-)-DCI durch Präinkubation der Zellen in (-)-Bupranolol

Um zu klären, ob die durch (-)-DCI in Gegenwart von MIX induzierte Zunahme des zellulären cAMP-Gehalts durch den β -Adrenoceptor übermittelt wird, versuchten wir, diese Zunahme durch Präinkubation der Zellen mit dem β -Adrenoceptorblocker (-)-Bupranolol zu hemmen. Hierzu wurden Zellkulturen mit 2×10^{-9} M, 1.4×10^{-8} M und 6×10^{-8} M (-)-Bupranolol 35-40 Minuten präinkubiert und anschließend 5 Minuten mit verschiedenen Konzentrationen (-)-DCI (15 min Präinkubation in 1 mM MIX) versetzt. Die durch (-)-DCI induzierte Zunahme des zellulären cAMP-Gehalts der kultivierten Rattenherzzellen wird in Gegenwart von (-)-Bupranolol gehemmt. Diese Hemmung kann durch Inkubation der Zellen in höheren Konzentrationen (-)-DCI durchbrochen werden (Abb. 37).

Konzentrationsquotienten zwischen gleicheffektiven Konzentrationen (-)-DCI, die in Gegenwart von (-)-Bupranolol und in Abwesenheit des β -Adrenoceptorblockers bestimmt wurden, sind anhand drei verschiedener Auftragsweisen der Effekte (Zunahme des cAMP Gehalts/mg Protein, Zunahme des cAMP Gehalts/Zelle, prozentuale Zunahme des cAMP Gehalts) ermittelt.

In Abb. 38 ist der log der ermittelten Konzentrationsquotienten -1 ($\log(KQ - 1)$) gegen den negativen log der entsprechenden Konzentration des Hemmers aufgetragen (Auftragung nach ARUNLAKSHANA und SCHILD, 1959). Die Steigung der anhand dieser Werte ermittelten Regressionsgeraden beträgt 1.11.

Diese Regression ist mit der Regressionsgeraden verglichen, die aus der Hemmung der positiv chronotropen Wirkung des partiellen Agonisten mit (-)-Bupranolol ermittelt wurde (gestrichelte Linie). Tabelle XVI und XVII ermöglichen einen Vergleich der Konzentrationsquotienten, die anhand der Hemmung des chronotropen Effekts ermittelt wurden, mit denen, die anhand der Hemmung der Änderung des cAMP-Gehalts bestimmt wurden. Das Ausmaß der Hemmung der durch (-)-DCI induzierten Zunahme des zellulären cAMP-Gehalts entspricht demjenigen, das man für die Hemmung des positiv chronotropen Effekts erwartet.

3.3.4 Effekt von 3',4'-Dihydroxy- β -Methylpropiophenon (U-0521) auf den zellulären cAMP-Gehalt kultivierter Rattenherzzellen

U-0521 bewirkt dosisabhängig eine Zunahme der Schlagfrequenz der kultivierten Rattenherzzellen. Die Frequenz erreicht bei Inkubation in 1×10^{-4} M U-0521 einen Maximalwert. Um festzustellen, ob das Propiophenon auch den zellulären cAMP-Gehalt erhöht, wurden Zellkulturen 1 Minute und 5 Minuten lang mit 1×10^{-4} M U-0521 versetzt. Eine Minute Inkubation in 1×10^{-4} M U-0521 erhöht den zellulären cAMP-Gehalt signifikant gegenüber

den Kontrollkulturen, während nach 5 Minuten Inkubation mit der gleichen Konzentration des Propiophenons keine signifikante Zunahme festzustellen ist (Abb. 39, Tabelle XII). Eine höhere Konzentration U-0521, nämlich 4 mM, bewirkt sofortigen Zelltod. Vergleicht man die Kinetiken der Frequenzzunahme, die durch 1×10^{-4} M U-0521 stimuliert wird, mit der Kinetik der durch die gleiche Konzentration bedingten Änderung des cAMP-Gehalts der Zellen, so zeigt sich, daß sie im Verlauf nicht übereinstimmen (Abb. 39). Die Frequenz erreicht nach einer Minute Inkubation eine maximale Zunahme, die über 5 Minuten erhalten bleibt. Demgegenüber hat der cAMP-Gehalt der Zellkultur nach 5 Minuten Inkubation wieder abgenommen.

Die durch 1×10^{-4} M induzierte Zunahme des zellulären cAMP-Gehalts kann durch 25 Minuten Präinkubation der Kultur in 10^{-8} M (-)-Bupranolol gehemmt werden (Tabelle XII).

Tabelle XII: Effekt von U-0521 auf den cAMP-Gehalt kultivierter Rattenherzzellen

Zell-charge	Vorbehandlung	Versuchsbedingung	Inkubationszeit (min)	cAMP-Gehalt/ mg Zellprotein (pMole)	t-Test gegenüber Kontrolle
A		Kontrolle	5	42 ± 4 (16)	
		0.4 μ M EDTA 1×10^{-4} M U-0521	5	47 ± 4 (12)	
B		Kontrolle	1	9.3 ± 1.2 (6)	$p < 0.02$
		0.4 μ M EDTA 1×10^{-4} M U-0521	1	15.5 ± 0.8 (6)	
		1×10^{-4} M U-0521	5	10.7 ± 1.3 (8)	
C		Kontrolle	1	10.7 ± 0.8 (8)	$p < 0.005$ $p < 0.05$
		0.4 μ M EDTA 1×10^{-4} M U-0521	1	16.4 ± 1.4 (8)	
		1×10^{-9} M (-) ISO	1	13.3 ± 0.8 (6)	
D ⁺)		Kontrolle	5	36 ± 1 (5)	$p < 0.001$
		4×10^{-3} M U-0521	5	27 ± 1 (6)	
		3×10^{-8} M (-) ISO	5	90 ± 10 (6)	
E		Kontrolle	1	6.3 ± 0.3 (3)	$p < 0.025$
		0.4 μ M EDTA 1×10^{-4} M U-0521	1	10.0 ± 1.0 (4)	
E	1×10^{-8} M (-)-Bupranolol 25 min	Kontrolle	1	7.0 ± 0.4 (4)	
		0.4 μ M EDTA 1×10^{-4} M U-0521	1	6.8 ± 0.7 (4)	
		1×10^{-9} M (-) ISO	1	6.5 ± 0.7 (4)	

Fortsetzung Tabelle XII:

- D⁺) Um höhere Konzentrationen U-0521 zu lösen, wurde eine 0.2 M Stammlösung in Äthanol angesetzt. Die Verdünnung des Äthanol im Kulturgefäß betrug 0.1%. Die Kontrollen und die Proben, zu denen (-)-Isoproterenol zugesetzt wurde, enthielten die gleiche Menge Äthanol.

3.3.5 Effekt von (-)-Isoproterenol auf den cAMP-Gehalt von Zellkulturen embryonaler Hühnerherzen

Wie bereits dargestellt, konnte nicht eindeutig geklärt werden, ob (-)-Isoproterenol an den nach unserer Methode kultivierten Herzzellen 10 Tage alter embryonaler Hühnchen positiv chronotrope Effekte induziert, da die Grundfrequenz der kultivierten Zellen keinen stabilen Wert behält. KAUFMANN und Mitarbeiter (1969) führten die Unempfindlichkeit kultivierter Hühnerherzzellen gegenüber einem Adrenalinstimulus auf eine enzymatische Verdauung des β -Adrenoceptors durch das bei der Zellpräparation verwendete Enzym Trypsin zurück. Da wir bei unseren Versuchsbedingungen ebenfalls keinen positiv chronotropen Effekt von Katecholaminen an kultivierten Hühnerherzzellen bestimmen und somit keine Aussage über einen intakten β -Adrenoceptor machen konnten, untersuchten wir, ob eventuell eine durch (-)-Isoproterenol stimulierte Zunahme des zellulären cAMP-Gehalts auftritt, die als Indiz für die Anwesenheit eines intakten β -Adrenoceptors gewertet werden kann.

Inkubiert man kultivierte Hühnerherzzellen in Konzentrationen (-)-Isoproterenol, die größer oder gleich 1×10^{-8} M sind, so nimmt der zelluläre cAMP-Gehalt zu. Die Zunahme hängt ab von der Inkubationszeit mit dem Katecholamin, von der verwendeten Isoproterenol-Konzentration sowie vom cAMP-Grundgehalt der Kontrollkulturen der Zellcharge.

Die Versuche, die in Abbildung 32 dargestellt sind, demonstrieren die Zunahme des cAMP-Gehalts kultivierter Hühnerherzzellen

nach Inkubation in 1×10^{-7} M (-)-Isoproterenol. Um alle aus Einzelversuchen gewonnenen Werte nützen zu können, wurde versucht, die Wirkung zu normieren. Dafür bietet sich die Auftragung der prozentualen Zunahme des cAMP-Gehalts, ausgehend vom Mittelwert des aus den jeweiligen Kontrollkulturen berechneten Grundgehalts an (Abb. 40). Diese prozentuale Auftragung ermöglicht ferner, die Werte, die für den zellulären cAMP-Gehalt bezogen auf Zellprotein und diejenigen, die bezogen auf die Zellzahl ermittelt wurden, in einer Abbildung zu vergleichen (Abb. 40, offene und geschlossene Symbole).

Die Kinetiken der Änderung des cAMP-Gehalts nach Inkubation in verschiedene Konzentrationen (-)-Isoproterenol sind in Abb. 41 dargestellt. Dabei wurden die Werte nach dem oben beschriebenen Verfahren normiert. Die von der jeweiligen Konzentration (-)-Isoproterenol induzierten maximalen Zunahmen des cAMP-Gehalts sind in Abb. 42 als Dosis-Wirkungskurve aufgetragen.

Der Effekt von (-)-Isoproterenol auf den cAMP-Gehalt der kultivierten Hühnerherzzellen kann durch 25 Minuten Präinkubation der Kultur in 1×10^{-8} M (-)-Bupranolol gehemmt werden (Abb. 42). Die Hemmung kann durch Inkubation in höheren Konzentrationen (-)-Isoproterenol durchbrochen werden. Durch Extrapolation läßt sich ein Konzentrationsquotient von ca. 60 zwischen gleich effektiven Konzentrationen (-)-Isoproterenol in Gegenwart und Abwesenheit des β -Adrenoceptorblockers (-)-Bupranolol abschätzen.

4. DISKUSSION

=====

Übersicht über den Umfang der erhaltenen Ergebnisse und kurze Darstellung der Diskussionspunkte

Die vorliegenden Ergebnisse haben gezeigt, daß verschiedene β -Adrenoceptorliganden ((-)-Isoproterenol, (-)-Noradrenalin, (-)-DCI) an kultivierten Ratten- und Katzenherzzellen positiv chronotrope Effekte induzieren und den zellulären cAMP-Gehalt erhöhen. Diese Effekte treten in Gegenwart von β -Adrenoceptorblockern ((-)-Bupranolol) nicht, oder erst bei höheren Konzentrationen der entsprechenden Agonisten auf. Anhand des Ausmaßes der Hemmung können Gleichgewichtsdissoziationskonstanten für den β -Adrenoceptorhemmstoff-Komplex berechnet werden. Für den partiellen Agonisten (-)-DCI kann auf Grund seiner Eigenschaft, β -Adrenoceptoren zu blockieren, zusätzlich die anteilige Rezeptorbesetzungskurve der β -Adrenoceptoren durch diesen Liganden berechnet werden. Es ist also möglich, die Konzentrationsabhängigkeit des durch (-)-DCI ausgelösten positiv chronotropen Effekts mit der anteiligen Rezeptorbesetzungskurve und mit der Erhöhung des zellulären cAMP-Gehalts zu vergleichen.

(-)-Isoproterenol induziert an kultivierten Hühnerherzzellen keinen nachweisbaren positiv chronotropen Effekt, ganz im Gegensatz zu Ratten- und Katzenherzzellen. Jedoch erhöht (-)-Isoproterenol sowohl bei kultivierten Hühner- als auch bei Rattenherzzellen den zellulären cAMP-Gehalt.

Das stickstofflose 3',4'-Dihydroxy- β -Methylpropiophenon stimuliert kultivierte Rattenherzzellen positiv chronotrop und erhöht den zellulären cAMP-Gehalt.

Aus diesen Ergebnissen lassen sich im einzelnen folgende Sätze formulieren und diskutieren:

- 4.1 Kultivierte Ratten- und Katzenherzzellen besitzen β -Adrenoceptoren, die positiv chronotrope Wirkungen vermitteln. Ein von (-)-Isoproterenol induzierter positiv chronotroper Effekt läßt sich an kultivierten Hühnerherzzellen nicht nachweisen.
- 4.2.1 β -Adrenoceptorliganden vermitteln über β -Adrenoceptoren mit gleichen Affinitätseigenschaften positiv chronotrope Effekte und erhöhen den zellulären cAMP-Gehalt.
- 4.2.2 Der Einfluß von (-)-Isoproterenol auf den cAMP-Gehalt kultivierter Hühnerherzzellen beweist, daß β -Adrenoceptoren auch in Zellkulturen embryonaler Hühnerherzen existieren.
- 4.3.1 Kultivationsbedingungen und Speziesunterschiede wirken sich auf den cAMP-Gehalt der Zellkulturen aus.
- 4.3.2 Die Phosphodiesterase bewirkt, daß die Gesamt-cAMP Konzentration der kultivierten Rattenherzzellen nicht die Adenyl-Cyclase-Aktivität widerspiegelt.
- 4.4 Einflüsse verschiedener Faktoren auf den cAMP-Gehalt. Modellvorstellungen aus der Kinetik des Gesamt-cAMP- und des chronotropen Effekts.
- 4.5 Der Vergleich der Dosisabhängigkeiten der Katecholamineffekte (positiv chronotroper Effekt, Erhöhung des cAMP Gehalts) läßt nur unter Einschränkungen ein Modell, bei dem cAMP als "second messenger" fungiert, gelten.
- 4.6 Das Vorhandensein einer Katecholgruppe bedingt die Eigenschaft eines β -Adrenoceptorliganden, Effekte zu induzieren, ohne eine große Anzahl von Rezeptoren zu besetzen. Es soll versucht werden, die unterschiedlichen Wirkungsweisen der verschiedenen β -Adrenoceptorliganden zu erklären.
- 4.7 Die isolierte kultivierte Herzzelle stellt ein vorteilhaftes Versuchssystem zum Studium von Reaktionen dar, die über den β -Adrenoceptor vermittelt werden.

4.1 KULTIVIERTE RATTEN- UND KATZENHERZZELLEN BESITZEN β -ADRENOCEPTOREN, DIE POSITIV CHRONOTROPE WIRKUNGEN VERMITTELN

Ein von (-)-Isoproterenol induzierter positiv chronotroper Effekt läßt sich an kultivierten Hühnerherzzellen nicht nachweisen.

In unseren Versuchen war die Empfindlichkeit der kultivierten Ratten- und Katzenherzzellen gegenüber Katecholaminen ähnlich. Auch andere Autoren beobachteten an kultivierten Herzzellen positiv chronotrope Effekte von Katecholaminen (WOLLENBERGER, 1964; ERTEL und Mitarbeiter, 1971; BODER und JOHNSON, 1972; GOSHIMA, 1973, 1974) und von (-)-DCI (BODER und JOHNSON, 1972). Die meisten dieser Autoren bestimmten jedoch keine Dosis-Wirkungskurven der Katecholamineffekte, so daß ein genauer Vergleich der Empfindlichkeiten der verschiedenen Zellen nicht möglich ist. Man kann lediglich feststellen, daß auch die anderen Autoren mit den von uns verwendeten Katecholaminkonzentrationen positiv chronotrope Effekte beobachteten. Nur BODER und JOHNSON (1972) fanden an kultivierten Herzzellen von ND₄-Mäusen nach Stimulation mit (+)-DCI eine geringere Empfindlichkeit. EC₅₀ des positiv chronotropen Effekts von
(+)-DCI (BODER und JOHNSON, 1972) : 1.5×10^{-6} M
(-)-DCI eigene Ergebnisse : 1.5×10^{-8} M

Die Verwendung des Razemats erklärt nicht den Empfindlichkeitsunterschied; denn es wäre in diesem Fall nur ein Empfindlichkeitsverlust um den Faktor zwei zu erwarten. Der Unterschied könnte eher durch die verschiedenen Versuchstierarten bedingt sein. Bei den Herzpräparaten sind ebenfalls solche speziesabhängigen Sensibilitätsunterschiede gegenüber DCI bekannt (Katzen- und Meerschweinchenherzen KAUMANN und BLINKS, 1967; Rattenherzen BARRET und CARTER, 1970; KAUMANN, unveröffentlicht).

Zwei Laboratorien konnten allerdings keinen von Katecholaminen induzierten positiv chronotropen Effekt an spontanschlagenden kultivierten Hühnerherzzellen beobachten (KAUFMANN und Mitarbeiter, 1969; SPERELAKIS, 1972). Uns gelang an Hühnerherzzellen ebenfalls kein eindeutiger Nachweis eines positiv chronotropen Effekts von Katecholaminen. Eine eindeutige Aussage ist nicht möglich, da die kultivierten Hühnerherzzellen bei unseren Versuchsbedingungen keine gleichmäßige stabile Spontanfrequenz besitzen. Die Unempfindlichkeit der Hühnerherzzellen gegenüber einem Katecholaminstimulus schrieben KAUFMANN und Mitarbeiter (1969) der tryptischen Verdauung des β -Adrenoceptors zu.

Demnach würde der β -Adrenoceptor der kultivierten Ratten- und Katzenherzzellen von dem Enzym nicht inaktiviert. Es könnte jedoch sein, daß die Affinität des β -Adrenoceptors zu den Aminen durch die Trypsinbehandlung gelitten hätte und wir trotzdem Effekte der Katecholamine bemerken. Um dies zu klären, müßten Affinitätskonstanten zwischen Katecholaminen und dem β -Adrenoceptor an gezüchteten Zellen ermittelt werden und mit den Konstanten verglichen werden, die an anderen Systemen bestimmt wurden. Wie bereits ausgeführt, können apparente Affinitätskonstanten zwischen Katecholaminen und dem β -Adrenoceptor aus funktionellen Daten nicht ermittelt werden (siehe S. 13). Wir bestimmten deshalb die Affinitäten des β -Blockers (-)-Bupranolol und des partiellen Agonisten (-)-DCI zum β -Adrenoceptor.

Die Werte der von uns ermittelten apparenten Dissoziationskonstanten K_B ($1/\text{Affinitätskonstante}$) für den (-)-Bupranolol-Rezeptorkomplex sind in der Tabelle XVI angegeben. Diese Konstanten, sowie die apparenten Dissoziationskonstanten für den (-)-DCI-Rezeptorkomplex (Tabelle VIII) unterscheiden sich nicht wesentlich von den Konstanten, die für die gleichen Substanzen an anderen Systemen ermittelt wurden (Tabelle XVIII). Kultivierte Ratten- und Katzenherzzellen besitzen demnach β -Adrenoceptoren mit den gleichen Affinitätseigenschaften wie Herz- β -Adrenoceptoren in anderen Systemen (vergleiche auch KAUMANN und Mitarbeiter, 1977b).

Die in Tabelle XVI zusammengefaßten Ergebnisse zeigen ferner, daß (-)-Bupranolol die positiv chronotropen Effekte von (-)-Isoproterenol und (-)-DCI in gleicher Weise hemmt. Bei einem Organpräparat erhält man dieses Ergebnis nur, wenn die Gleichgewichtsdissoziationskonstante in Gegenwart eines Hemmers der COMT bestimmt wurde. Die COMT verringert die Katecholaminkonzentration in der Biophase und übt deshalb einen störenden Einfluß auf die Bestimmung von Gleichgewichtsdissoziationskonstanten aus (KAUMANN, 1970, 1972). (-)-DCI ist jedoch kein Substrat der COMT. Im Herzgewebe reagieren deshalb bei niederen Katecholaminkonzentrationen im Versuchsbad nur Zellen der Muskeloberfläche, während tiefer liegende Zellen von den Aminen nicht erreicht werden. Die extraneuronale Aufnahme der Katecholamine, verknüpft mit ihrer Inaktivierung durch die COMT, versteilert den Konzentrationsgradienten innerhalb des Gewebes (KAUMANN, 1970, 1972). Bei isolierten kultivierten Zellen sind kaum Diffusionsstrecken zwischen Biophase (FURCHGOTT, 1955) und Medium vorhanden. Deshalb hat die Inaktivierung der Katecholamine durch die COMT wenig Einfluß auf die Bestimmung von Gleichgewichtsdissoziationskonstanten, was durch die Übereinstimmung des Hemmeffektes von (-)-Bupranolol bei Verwendung der unterschiedlichen Agonisten bewiesen ist.

4.2.1 β -Adrenoceptorliganden vermitteln über β -Adrenoceptoren mit gleichen Affinitätseigenschaften positiv chronotrope Effekte und erhöhen den zellulären cAMP-Gehalt

Das "second messenger"-Konzept (SUTHERLAND und Mitarbeiter, 1968) fordert, daß cAMP an der Übermittlung der durch Katecholamine induzierten Effekte beteiligt ist. Demnach sollte ein Vergleich der Konzentrationsabhängigkeiten der von β -Adrenoceptorliganden verursachten

- a) positiv chronotropen Effekte,
- b) der Änderung des cAMP-Gehalts und
- c) der fraktionellen Rezeptorbesetzung der β -Adrenoceptoren

Aufschluß darüber geben, ob überhaupt oder auf welche Weise das cyclische Nukleotid diese Wirkungen vermittelt. Um diese Frage klären zu können, muß zuerst untersucht werden, ob die β -Adrenoceptorliganden den cAMP-Gehalt kultivierter Ratten- und Hühnerherzzellen beeinflussen, welche Zeit- und Konzentrationsabhängigkeiten diese Effekte aufweisen, und ob diese Effekte über β -Adrenoceptoren mit den gleichen Affinitätseigenschaften vermittelt werden wie die positiv chronotropen Effekte. Die von (-)-Isoproterenol und (-)-DCI induzierte Zunahme des zellulären cAMP-Gehalts der untersuchten Zellkulturen ist abhängig von der Inkubationszeit und von der Konzentration des verwendeten Liganden (Abb. 24-28, 32, 36, 41).

Um Aussagen über die Affinitätseigenschaften der β -Adrenoceptoren zu erhalten, die den Effekt der Katecholamine auf den cAMP-Gehalt der kultivierten Zellen vermitteln, wurden Konzentrationsquotienten zwischen gleich effektiven Konzentrationen (-)-Isoproterenol in Gegenwart und Abwesenheit von (-)-Bupranolol bestimmt (Tabelle XVII, Abb. 32, 42). Diese Konzentrationsquotienten unterscheiden sich nicht wesentlich von den Konzentrationsquotienten, die man nach den Werten der Tabelle XVI und Abb. 15 für die kompetitive Hemmung des positiv chronotropen Effekts von (-)-Isoproterenol erwarten würde. Ebenso hemmt (-)-Bupranolol die Wirkung von (-)-DCI auf den zellulären cAMP-Gehalt (Tabelle XVII, Abb. 37, 38) in gleicher Weise wie den positiv chronotropen Effekt des partiellen Agonisten (Abb. 17). Trotz der großen Streuung der Meßwerte für den cAMP-Gehalt der Zellen glauben wir aussagen zu können, daß sowohl die positiv chronotropen Effekte als auch die Erhöhung des cAMP-Gehalts der kultivierten Zellen, die von (-)-Isoproterenol und (-)-DCI hervorgerufen werden, über β -Adrenoceptoren mit den gleichen Affinitätseigenschaften vermittelt werden.

4.2.2 Der Einfluß von (-)-Isoproterenol auf den cAMP-Gehalt kultivierter Hühnerherzzellen beweist, daß β -Adrenoceptoren auch in Zellkulturen embryonaler Hühnerherzen existieren

Im Ergebnisteil wurde bereits ausgeführt, daß in Zellkulturen embryonaler Hühnerherzzellen (-)-Isoproterenol den cAMP-Gehalt erhöht. Dieser Effekt wird durch β -Adrenoceptoren vermittelt, die ähnliche Affinitätseigenschaften aufweisen, wie die β -Adrenoceptoren, die in anderen Systemen chronotrope Effekte übermitteln (Tabelle XVII, Abb. 42). Demnach ist die Vermutung von KAUFMANN und Mitarbeitern (1969), das Fehlen eines positiv chronotropen Effekts der Katecholamine an kultivierten Hühnerherzzellen sei auf eine Schädigung der β -Adrenoceptoren zurückzuführen, widerlegt. Vielmehr muß die Ursache für das Ausbleiben der positiv chronotropen Effekte an einer anderen Stelle des Reaktionssystems gesucht werden.

Da der Fibroblastenanteil in Hühnerherzzellkulturen etwa 50% beträgt, können andererseits aus diesem Ergebnis auch keine Rückschlüsse darüber gezogen werden, ob oder in wie weit die gemessene cAMP-Konzentration in irgendeiner Beziehung zu den Vorgängen bei der Zellkontraktion der kultivierten Hühnerherz-zelle steht. Andererseits ist es unwahrscheinlich, daß bei einer Zelldissoziation durch Trypsin nur die β -Adrenoceptoren der Myoblasten beschädigt werden, während die β -Adrenoceptoren der Fibroblasten erhalten bleiben.

Allerdings ist eine Aussage über eine durch die Trypsinbehandlung bedingte Verminderung der Zahl der β -Adrenoceptoren pro Zelle nicht möglich. Um hierüber Aufschlüsse zu erhalten, müssen vergleichende Bindungsstudien mit radioaktiv markierten Liganden an Hühner- und Rattenherzzellen durchgeführt werden.

Es bleibt zu klären, warum (-)-Isoproterenol an kultivierten Hühnerherzzellen keinen positiv chronotropen Effekt induziert.

Da andere Autoren (WOLLENBERGER, 1964) positiv chronotrope Effekte von Katecholaminen an Hühnerherzzellen in Kultur beobachten konnten, müssen Kultivations- und Präparationsbedingungen der Hühnerzellen überprüft werden, um die Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse zu finden. Eine Erklärung für das Ausbleiben des positiv chronotropen Effekts der Katecholamine bei kultivierten Hühnerherzzellen wäre folgende Annahme: Die Übermittlung des positiv chronotropen Effekts ist an irgendeinem Schritt einer Reaktionsfolge hinter dem β -Adrenoceptor entkoppelt.

Die der Reaktion zwischen Ligand und β -Adrenoceptor nachgeschalteten Schritte sollen im Folgenden genauer untersucht werden. Dabei interessiert uns vor allem, ob cAMP in die Reaktionsfolge der Übermittlung des von β -Adrenoceptorliganden induzierten positiv chronotropen Effekts eingeschaltet ist. Zur Klärung dieses Problems eignet sich jedoch am besten ein Versuchssystem, das sowohl positiv chronotrope Effekte als auch eine Änderung des cAMP-Gehalts nach Zugabe von β -Adrenoceptorliganden zeigt, nämlich die kultivierte Rattenherzzelle.

4.3.1 Kultivationsbedingungen und Speziesunterschiede wirken sich auf den cAMP-Gehalt der Zellkulturen aus

(-)-Isoproterenol erhöht je nach verwendeter Tierart den cAMP-Gehalt der kultivierten Zellen auf unterschiedliche Weise. Dies wird beim Vergleich der Ergebnisse, die an Rattenherzzellen und Hühnchenherzzellen gewonnen wurden, deutlich:

- a) Rattenherzzellkulturen reagieren innerhalb der ersten Minute nach Zusetzen von (-)-Isoproterenol und erreichen dabei einen maximalen cAMP-Gehalt (Abb. 24, 25, 26).
Hühnerherzzellkulturen benötigen bis zu zwei Minuten Inkubationszeit, um eine maximale Stimulierung zu erhalten (Abb. 40, 41).

- b) Der cAMP-Gehalt von Rattenherzzellkulturen, die mit 1×10^{-9} M und 1×10^{-8} M (-)-Isoproterenol inkubiert wurden, fällt nach Erreichen des Maximalwertes innerhalb fünf Minuten bis zu 60% wieder ab (Abb. 24, 25, 26).
Hühnerherzzellen behalten, gerade bei Inkubation in schwach wirksamen Konzentrationen (-)-Isoproterenol, den maximal erreichten cAMP-Gehalt fünf Minuten lang (Abb. 41).
- c) In Rattenherzzellkulturen induziert (-)-Isoproterenol eine Zunahme des zellulären cAMP-Gehalts schon bei zehnfach niedrigeren Konzentrationen.
- d) (-)-Isoproterenol erhöht den zellulären cAMP-Gehalt in Rattenherzzellkulturen stärker als in Hühnerherzzellkulturen.

KELLY und Mitarbeiter (1974) berichten ebenfalls von einer unterschiedlichen Reaktivität verschiedener Fibroblastentypen nach Inkubation in (-)-Isoproterenol. Dieses Verhalten äußerte sich im Verlauf der Kinetik und in der Maximalkonzentration des cAMP-Gehalts.

Außerdem beeinflussen die Kultivationsbedingungen den cAMP-Grundgehalt der Zellen und deren Reaktivität auf eine Stimulierung durch Katecholamine. So ist der cAMP-Grundgehalt der Einzelzelle in Zellkulturen mit großer Zelldichte geringer als in Zellkulturen mit kleiner Zelldichte. Dies konnte für folgende Zelltypen gezeigt werden:

<u>Zelltypen</u>	<u>Autoren</u>
Fibroblasten	HASLAM und GOLDSTEIN (1974) KELLY und BUTCHER (1974)
Astrocyten	CLARK und PERKINS (1971)
Fettzellen	SCHWABE und EBERT (1972)
Rattenherzzellen	diese Arbeit (Abb. 22)
Hühnerherzzellen	diese Arbeit (Abb. 23)

CLARK und Mitarbeiter (1975) sowie CHLAPOWSKI und Mitarbeiter (1975) konnten darüberhinaus feststellen, daß die Reaktivität

kultivierter Zellen auf eine Katecholaminstimulation bei geringer Zellzahl pro Kultur stärker ausgeprägt ist. Da in unseren Versuchen der cAMP-Grundgehalt in Zellkulturen von 3×10^6 Zellen/Kultur weniger streut als derjenige, der bei geringer Zelldichte bestimmt wurde, verwendeten wir zell dichtere Kulturen für unsere Versuche. Dabei nahmen wir in Kauf, daß die durch β -Adrenoceptorliganden induzierte Zunahme des cAMP-Gehalts eventuell bei großer Zelldichte geringer ist. Das zur Kultivation verwendete Serumsupplement vermindert bei Astrocyten (MARKMANN und Mitarbeiter, 1974) und Fibroblasten (CHLAPOWSKI und Mitarbeiter, 1975) den cAMP-Grundgehalt sowie die Reaktivität der Zellen auf eine Stimulierung mit Katecholaminen. Ein Einfluß des Pferdeserums auf den cAMP-Gehalt der Rattenherzzellkulturen konnte von uns nicht nachgewiesen werden. Die Werte, die bei Inkubation der Zellen in serumhaltigem Medium ermittelt wurden, unterscheiden sich nicht von denen, die in serumfreiem Medium bestimmt wurden (Abb. 22). Wir bestimmten deshalb den cAMP-Gehalt kultivierter Rattenherzzellen in serumfreiem Medium, da das Serumsupplement die Proteinbestimmung verfälscht.

4.3.2 Die Phosphodiesterase bewirkt, daß die Gesamt-cAMP-Konzentration kultivierter Rattenherzzellen nicht die Adenylyl-Cyclase-Aktivität widerspiegelt

Wir gingen bei unseren Untersuchungen von der Überlegung aus, daß ein Vergleich der durch β -Adrenoceptorliganden induzierten positiv chronotropen Effekte mit der Erhöhung des zellulären cAMP-Gehalts Aufschlüsse über die Gültigkeit eines "second messenger"-Modells liefern sollte. Wir mußten bei den ersten Untersuchungen jedoch feststellen, daß 1×10^{-10} M (-)-Isoprotterenol an kultivierten Rattenherzzellen keine Zunahme des zellulären cAMP-Gehalts stimuliert, während chronotrope Effekte bereits

bei niedrigeren Konzentrationen ausgelöst werden können (Tabelle X, Abb. 11, 12). Dieser Befund scheint - oberflächlich betrachtet - einem "second messenger"-Konzept, in dem cAMP als Vermittler der Katecholamineffekte fungiert, zu widersprechen. Die gleiche Konzentration (-)-Isoproterenol induziert jedoch nach Hemmung der Phosphodiesterase mit 1 mM MIX eine signifikante Zunahme des zellulären cAMP-Gehalts.

Ebenso induziert auch 1×10^{-6} M (-)-DCI nur nach Hemmung der Phosphodiesterase eine Zunahme des zellulären cAMP-Gehalts. Dieses Ergebnis erstaunt umso mehr, da gerade diese Konzentration des partiellen Agonisten den maximalen positiv chronotropen Effekt hervorruft.

Auch andere Autoren untersuchten Zellen, bei denen ausschließlich in Gegenwart von MIX eine von β -Adrenoceptorliganden stimulierte Zunahme des zellulären cAMP-Gehalts beobachtet werden konnte.

<u>Zelltypen</u>	<u>Testsubstanz</u>	<u>Autoren</u>
Epidermiscarcinomzellen	Isoproterenol Adrenalin Noradrenalin	KELLY und BUTCHER (1975)
Rattenleberzellen		GILMAN (1974)
Neuroblastomazellen	Adrenalin Noradrenalin Dopamin	SCHULZ und HAMBPECHT (1973)
Rattenherzzellen	(-)-DCI	diese Arbeit (Tabelle XI)

Diese Ergebnisse stellen folgende Forderung an ein "second messenger"-Modell für die Übermittlung der von β -Adrenoceptorliganden induzierten positiv chronotropen Effekte (Modell II, Abb. 1b): Die funktionsübermittelnden Systeme müßten räumlich eng kompartimentiert sein. Die Phosphodiesterase wäre dem funktionsvermittelnden Ort nachgeschaltet, so daß der Gesamt-cAMP

Gehalt der Zelle nicht die Konzentration des cyclischen Nukleotids in dem Kompartiment widerspiegelt, das für die Übermittlung des positiv chronotropen Effekts verantwortlich wäre.

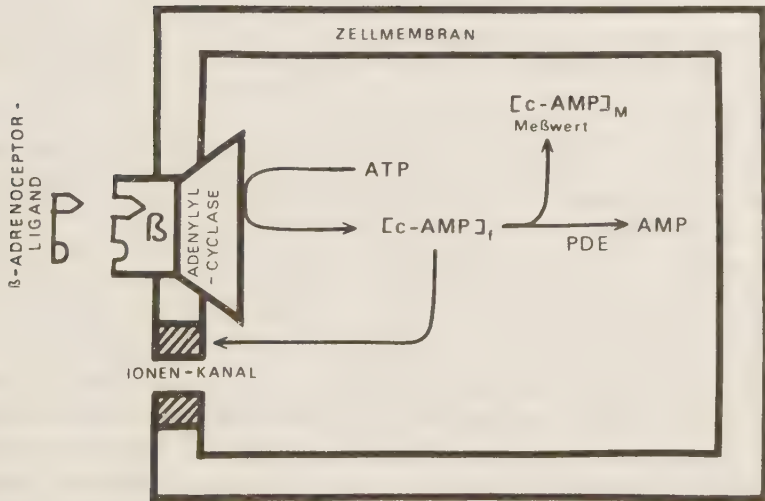


Abb. 1b, Modell II: Der Meßwert des cAMP-Gehalts der Zellen entspricht nicht der für eine Funktion wesentlichen Konzentration $[cAMP]_f$, da die Phosphodiesterase (PDE) dem funktionsvermittelnden Kompartiment nachgeschaltet ist.

4.4 EINFLÜSSE VERSCHIEDENER FAKTOREN AUF DEN cAMP GEHALT. MODELLVORSTELLUNGEN AUS DER KINETIK DES GESAMT cAMP UND DES CHRONOTROPEN EFFEKTS

Inwieweit ist es möglich, unter bestimmten Voraussetzungen, anhand der Meßwerte der Änderung des cAMP-Gehalts indirekt Anhaltspunkte über eine Gültigkeit des "second messenger"-Konzepts für die Übermittlung des durch β -Adrenoceptorliganden stimulierten positiv chronotropen Effekts zu erhalten? Ein Vergleich der Kinetiken der Änderung des zellulären cAMP-Gehalts, die in Gegenwart und Abwesenheit des Phosphodiesterasehemmers MIX bestimmt wurden, mit der Kinetik der positiv chronotropen Effekte sollte zur Klärung dieser Frage beitragen. Die Kinetiken der Zunahme des cAMP-Gehalts, induziert durch Inkubation der Zellen in 1×10^{-9} M und 1×10^{-8} M (-)-Isoproterenol und diejenigen, der durch die gleichen Konzentrationen des Katecholamins stimulierten positiv chronotropen Effekte, stimmen jedoch in ihrem Verlauf nicht überein (Abb. 24, 25). Bei Gültigkeit der "second messenger"-Theorie würde man eher annehmen, daß eine chronotrope Gleichgewichtswirkung mit einem gleichbleibenden cAMP-Gehalt der Zellen gekoppelt ist. Die oben beschriebenen Befunde lassen sich nur dann mit einem "second messenger"-Konzept in Einklang bringen, wenn man von der Annahme ausgeht, daß die für die Übermittlung der chronotropen Effekte wesentliche cAMP-Konzentration nicht mit der gemessenen cAMP-Konzentration identisch wäre (Modell II, Abb. 1b). Auch BUTCHER und Mitarbeiter (1968) beobachteten bei vergleichenden Untersuchungen über die Lipolyse in Fettzellen ebenfalls unterschiedliche Reaktivität der Zellen nach Katecholaminstimulus und zwar bezüglich cAMP-Gehalt und Lipolyseaktivität.

Eine transitorische Form der Kinetik der Änderung des cAMP-Gehalts nach Katecholaminstimulus, ähnlich der von uns beobachteten, wurde auch von anderen gefunden (in Zellkulturen von KUO und DERENZO, 1969; SCHWABE und EBERT, 1972; HASLAM und GOLDSTEIN,

1974; KELLY und Mitarbeiter, 1974; in Gewebepreparaten von ROBINSON und Mitarbeiter, 1965; KAKIUCHI und Mitarbeiter, 1969). Es gilt nun zu klären, welche Faktoren für diesen Verlauf der Kinetiken der Änderung des zellulären cAMP-Gehalts verantwortlich sein könnten:

- a) Ein oxidativer Abbau der Katechole könnte den Zeitverlauf erklären; besonders, da in Gegenwart des stabilen (-)-DCI dieser Verlauf der Kinetik nicht auftritt. Dagegen spricht aber, daß die durch Katecholamine induzierte Zunahme der Spontanfrequenz der kultivierten Zellen einen Gleichgewichtswert erreicht, der über einen Zeitraum von fünf Minuten erhalten bleibt (Abb. 24, 25), während der cAMP-Gehalt gleichzeitig abnimmt. Außerdem ist bei Inkubation von Hühnchenzellen gerade in niedrige Konzentrationen (-)-Isoproterenol keine transitorische Kinetik der Änderung des cAMP-Gehalts unter den gleichen Versuchsbedingungen festzustellen (Abb. 41). Ferner enthält das Kulturmedium 10^{-4} M Ascorbinsäure, eine Konzentration, die den oxidativen Abbau von Katecholen verhindern sollte. Aufgrund dieser Tatsachen erscheint es uns unwahrscheinlich, daß der Abbau von (-)-Isoproterenol für den transitorischen Verlauf der Kinetik der Änderung des cAMP-Gehalts kultivierter Rattenherzzellen verantwortlich sei.
- b) Ferner könnte eine Abgabe von cAMP ins Kulturmedium den Verlauf der Kinetik erklären (CHLAPOWSKI und Mitarbeiter, 1975). Wir konnten jedoch unter keiner Versuchsbedingung cAMP im Medium messen.
- c) Der Verlauf der Kinetik könnte außerdem mit einer Aktivierung der Phosphodiesterase durch cAMP erklärt werden. In diesem Fall müßte sich nach Hemmung dieses Enzyms durch 1 mM MIX der Verlauf der Kinetik ändern. Wie Abb. 25 zeigt, ist dies jedoch nicht der Fall. Deshalb schliessen wir, daß eine verstärkte Aktivierung der Phosphodiesterase durch das Substrat (cAMP) nicht für die transitorische Form der Kinetik verantwortlich ist.

- d) Kultivierte Fettzellen setzen nach Stimulierung mit Katecholaminen, ACTH oder Glucagon, jedoch nicht nach Stimulierung mit Prostaglandinen einen Hemmer der Hormonaktivität frei, der für die Wiederabnahme des cAMP-Gehalts nach der Stimulation verantwortlich sein könnte (HO und SUTHERLAND, 1971; MANGANIELLO und Mitarbeiter, 1971). Ein ähnlicher Mechanismus könnte auch in unseren Versuchen an Rattenherzzellen den Verlauf der Kinetiken des cAMP-Gehalts beeinflussen. Bei Gültigkeit eines "second messenger" Konzepts müßte sich jedoch dieser Mechanismus auch an der Kinetik der positiv chronotropen Effekte bemerkbar machen.
- e) Will man nach den vorhergehenden Überlegungen ein "second messenger" Modell der Übermittlung der von Katecholaminen stimulierten Effekte durch cAMP entwickeln, muß ein unabhängiger cAMP Umwandlungsmechanismus neben der Phosphodiesterase gefordert werden, der ebenfalls dem eventuellen funktionsübermittelnden Kompartiment nachgeschaltet ist (Modell III).

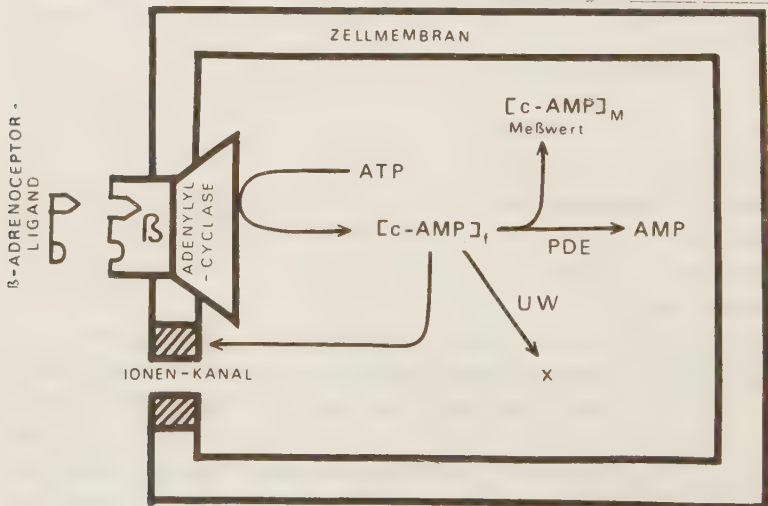


Abb. 1c, Modell III: Der Meßwert des cAMP-Gehalts der Zellen wird durch die Phosphodiesterase (PDE) und einen postulierten zusätzlichen Umwandlungsmechanismus beeinflusst (UW). Der Meßwert entspricht nicht der funktionellen cAMP-Konzentration ($[c\text{AMP}]_f$).

Um die Gültigkeit des Modells III einigermaßen zu rechtfertigen, müßten sich auch folgende Tatsachen an ihm erklären lassen: Wie Abb. 26 zeigt, unterscheidet sich der Verlauf der Kinetik der Änderung des cAMP-Gehalts, die durch 1×10^{-5} M (-)-Isoproterenol in Gegenwart von MIX induziert wurde, von dem Verlauf der Kinetik, die ohne den Einfluß des Phosphodiesterasehemmers bestimmt wurde. Bei Gültigkeit des Modells III könnte man annehmen, daß in Gegenwart dieser hohen Konzentration (-)-Isoproterenol so viel cAMP produziert würde, daß der geforderte Umwandlungsmechanismus (UW, Modell III) gesättigt wäre. Eine zusätzliche Hemmung der Phosphodiesterase (PDE) führte dann zu einer Anhäufung des cyclischen Nukleotids in der Zelle.

Auffällig ist ferner der unterschiedliche Verlauf der Kinetiken der Änderung des zellulären cAMP-Gehalts nach Stimulation der Zellen mit (-)-DCI und mit (-)-Isoproterenol (wir vergleichen im Folgenden nur die Kinetiken, die in Gegenwart von MIX bestimmt wurden, da (-)-DCI überhaupt nur nach Hemmung der Phosphodiesterase eine Zunahme des zellulären cAMP-Gehalts induziert).

- a) 1×10^{-10} M, 1×10^{-9} M und die chronotrop nahezu maximal effektive Konzentration 1×10^{-8} M (-)-Isoproterenol induzieren eine Zunahme des cAMP-Gehalts der kultivierten Rattenherzzellen mit transitorischer Kinetik (Abb. 26, 30, 31).
- b) 2×10^{-8} M (-)-DCI induziert ähnliche positiv chronotrope Effekte wie Konzentrationen zwischen 1×10^{-10} und 1×10^{-9} M (-)-Isoproterenol (Abb. 11, 12, 24). Die Zunahme des cAMP-Gehalts, die von dieser Konzentration des partiellen Agonisten hervorgerufen wird, zeigt die Form einer Sättigungskinetik.
- c) 1×10^{-6} M (-)-DCI induziert ähnliche positiv chronotrope Effekte wie 3×10^{-9} M (-)-Isoproterenol (Abb. 11, 12). Diese Konzentration des partiellen Agonisten ruft eine über 5 Minuten fortdauernde Zunahme des cAMP-Gehalts hervor (Abb. 34).

Dieses unterschiedliche Verhalten der beiden β -Adrenoceptor-liganden könnte wie folgt erklärt werden: Eine schnelle Aktivierung der Adenylyl-Cyclase durch (-)-Isoproterenol bedingt eine überschießende Kinetik, weil die cAMP abbauenden Systeme nicht entsprechend schnell aktiviert werden. Dagegen würde die Adenylyl-Cyclase durch (-)-DCI nur langsam aktiviert und die cAMP-abbauenden Systeme können den cAMP-Gehalt gleichzeitig beeinflussen. Eine Sättigungskinetik resultiert.

Gilt das "second messenger"-Konzept, so müßte eine schnellere Aktivierung der Adenylyl-Cyclase auch zu einem schnelleren Einsetzen des positiv chronotropen Effekts führen. Die Kinetik des positiv chronotropen Effekts von 1×10^{-9} M (-)-Isoproterenol müßte früher einsetzen als die Kinetik des positiv chronotropen Effekts von 2×10^{-8} M (-)-DCI. Wie die folgende Tabelle XIII zeigt, unterscheiden sich jedoch die Halbwertszeiten der entsprechenden Kinetiken nicht signifikant, die obige Erklärung trifft also nicht zu.

Tabelle XIII: Vergleich der Halbwertszeiten der Kinetiken des positiv chronotropen Effekts von (-)-Isoproterenol und (-)-DCI

Abb. Nr.	Ligand	Konzentration	$t_{1/2}$ Frequenz-zunahme ($\bar{x} \pm$ SEM sec)	Maximale Frequenzzunahme (Schläge/Minute)
33	(-)-DCI	2×10^{-8} M	35.8 ± 8.9 n=6	16
24	(-)-Iso-proterenol	1×10^{-9} M	23.5 ± 1.8 n=6	15

Die folgenden Modell-Vorschläge könnten den bisher angestellten Überlegungen Rechnung tragen (Modell IV und V). Beide Modelle gehen davon aus, daß cAMP unabhängig von der Phosphodiesterase durch ein weiteres System umgewandelt wird, bzw. nicht mehr

meßbar vorliegt. (-)-Isoproterenol, aber nicht (-)-DCI, aktiviert zusätzlich diese Umwandlung:

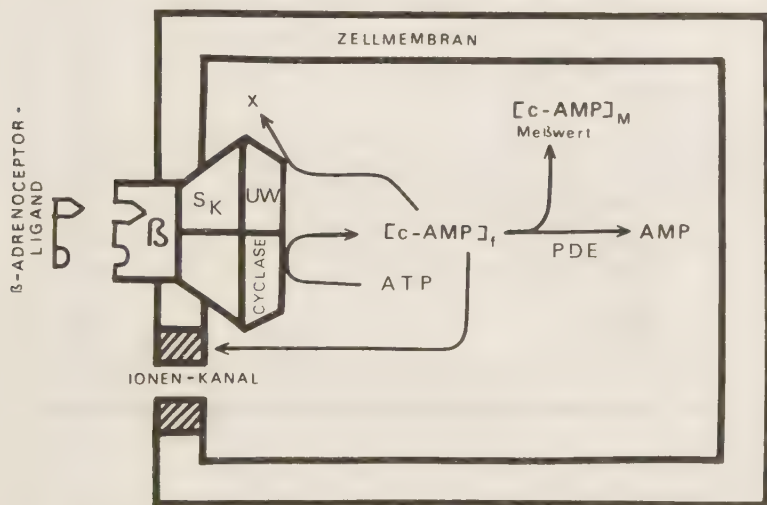


Abb. 1d, Modell IV: β -Adrenoceptorliganden besitzen Strukturen, die für die Übermittlung der Effekte (W) und solche, die für die Affinität zum β -Adrenoceptor (A) verantwortlich sind. Wechselwirkung der Liganden mit dem β -Adrenoceptor (β) stimuliert die Adenylyl-Cyclase. Dieses Enzym katalysiert die Reaktion $ATP \rightarrow cAMP$. cAMP seinerseits wird durch das cytoplasmatische Enzym Phosphodiesterase (PDE) in AMP umgewandelt. Ferner wird das cyclische Nukleotid durch das postulierte umwandelnde System (UW) in ein unbekanntes Produkt (X) verwandelt oder in eine nicht meßbare Form überführt. Besitzt der Ligand eine Katecholgruppe, so wird das umwandelnde System zusätzlich über ein stimulierendes Kompartiment (S_K) aktiviert und somit die Umwandlung des cAMP in X beschleunigt. Da der Meßwert des cAMP-Gehalts ($[cAMP]_M$) nicht mit dem gemessenen positiv chronotropen Effekt korreliert, könnte das durch die Cyclase produzierte cAMP direkt auf die eventuell eng räumlich benachbarten Ionenkanäle wirken, wobei sich weder Phosphodiesterase noch das umwandelnde System bei der Übermittlung des positiv chronotropen Effekts bemerkbar machen.

Eine andere Erklärungsmöglichkeit wäre: Das Umwandlungsprodukt selbst, oder eine durch es induzierte Reaktionsfolge wirkt auf die Ionenkanäle (Modell V).

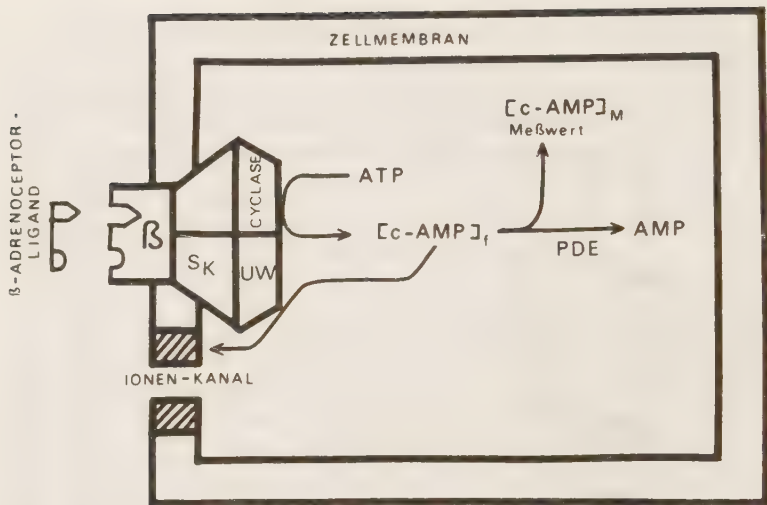


Abb. 1e, Modell V

Die aufgezeigten Modelle sollen eine Diskussionsgrundlage darstellen. Solange nicht geklärt ist, ob cAMP wirklich als "second messenger" bei der Übermittlung des positiv chronotropen Effekts der Katecholamine beteiligt ist und ob das Meßkompartiment in Verbindung zum funktionsvermittelnden Kompartiment steht, kann das entwickelte Modell nur als Anhaltspunkt für die Durchführung weiterer Untersuchungen dienen.

Nimmt man an, cAMP sei nicht der "second messenger" bei der Übermittlung des positiv chronotropen Effekts der Katecholamine, könnten die Ergebnisse auch durch folgende Mechanismen erklärt werden:

- a) Es gibt zwei Typen von β -Adrenoceptorsystemen, die beide die gleiche Affinität zu Liganden besitzen. Der eine Typ Rezeptor ist an die Adenylyl-Cyclase gekoppelt, der andere an einen Ionenkanal, der den positiv chronotropen Effekt vermittelt.

- b) Es existiert nur ein Typ β -Adrenoceptor. Dieser ist gleichzeitig an die Adenyl-Cyclase und an einen Ionenkanal gekoppelt. Die Wechselwirkung zwischen Ionenkanal und Rezeptor erfolgt direkt.

4.5 DER VERGLEICH DER DOSISABHÄNGIGKEITEN DER KATECHOLAMIN-EFFEKTE (POSITIV CHRONOTROPER EFFEKT, ERHÖHUNG DES cAMP-GEHALTS) LÄSST NUR UNTER EINSCHRÄNKUNGEN EIN MODELL, BEI DEM cAMP ALS "SECOND MESSENGER" FUNGT, GELTEN

Untersuchungen mit (-)-DCI

Die fraktionelle Rezeptorbesetzungskurve der β -Adrenoceptoren durch (-)-DCI (ermittelt anhand des Antagonismus zwischen (-)-DCI und (-)-Isoproterenol) ist eng mit der Dosis-Wirkungskurve des von (-)-DCI induzierten positiv chronotropen Effekts assoziiert (Abb. 35, 36). Das gleiche Ergebnis erhält man bei Versuchen mit (-)-DCI an rechten Vorhöfen der Ratte (KAUMANN, unveröffentlicht).

Da der cAMP-Gehalt der kultivierten Zellen nach Inkubation mit (-)-DCI in der Form einer Sättigungskinetik zunimmt, nehmen wir an, daß die Änderung des zellulären cAMP-Gehalts hier eher der Adenyl-Cyclase-Aktivität proportional ist, als z.B. nach (-)-Isoproterenolstimulus. Die Dosis-Wirkungskurve des positiv chronotropen Effekts, die fraktionelle Rezeptorbesetzungskurve und die Dosis-Wirkungskurve der Zunahme des cAMP-Gehalts (5 Minuten Inkubation) zeigen eine annähernde Übereinstimmung in der Konzentrationsabhängigkeit von dem partiellen Agonisten (Abb. 35, 36). Diese annähernde Übereinstimmung unterstützt das Konzept, daß das cyclische Nukleotid der "second messenger" bei der Übermittlung des positiv chronotropen Effekts von (-)-DCI sei. Dies gilt allerdings nur, wenn man die zuvor diskutierte enge räumliche Anordnung zwischen Adenyl-Cyclase und funktionellem Kompartiment annimmt.

Untersuchungen mit (-)-Isoproterenol

Die transitorische Kinetik der Änderung des cAMP-Gehalts nach (-)-Isoproterenolstimulus erschwert es, eine Dosis-Wirkungsbeziehung aufzustellen, die mit der Dosis-Wirkungskurve der chronotropen Gleichgewichtseffekte des Katecholamins verglichen werden könnte. Um überhaupt eine Dosis-Wirkungskurve der Änderung des zellulären cAMP-Gehalts bestimmen zu können, wählten wir eine Inkubationszeit von 1 Minute in (-)-Isoproterenol, weil 1. der maximale Effekt, der nach dieser Zeit gemessen werden kann, wohl am ehesten mit der Adenylyl-Cyclase-Aktivität korrelierbar ist und weil 2. bei noch kürzeren Inkubationszeiten der experimentelle Fehler (Mischen und Abpipettieren) sich stärker bemerkbar macht.

Die entsprechend diesen Überlegungen bestimmte Dosis-Wirkungskurve der Änderung des cAMP-Gehalts (1 Minute Inkubation in (-)-Isoproterenol) ist gegenüber der Dosis-Wirkungskurve des positiv chronotropen Effekts (Gleichgewichtswirkung) in den Bereich höherer Katecholaminkonzentrationen verschoben (Abb. 28, 11, 12).

Tabelle XIV: Vergleich der EC₅₀ der Dosis-Wirkungskurven des positiv chronotropen Effekts und der Zunahme des cAMP-Gehalts nach Isoproterenolstimulus

Abb. Nr.	Dosis-Wirkungskurve des	EC ₅₀ (-)-Isoproterenol ($\bar{x} \pm \text{SEM}$)	n
28	zellulären cAMP-Gehalts	$4.9 \pm 1.8 \times 10^{-9} \text{ M}$	3
11 12	positiv chronotropen Effekts	$2.3 \pm 1.6 \times 10^{-10} \text{ M}$	6

Aufgrund dieses Ergebnisses könnte man jetzt vermuten: Die Phosphodiesterase beeinflusst die Konzentrationsabhängigkeit der Zunahme des zellulären cAMP-Gehalts und ist somit für die

Verschiebung der Dosis-Wirkungskurve zu höheren Katecholamin-konzentrationen verantwortlich. Um diesen Einwand zu entkräften, untersuchten wir die Konzentrationsabhängigkeit der Änderung des cAMP-Gehalts in Gegenwart des Phosphodiesterasehemmers MIX (Abb. 29). In Gegenwart des Phosphodiesterasehemmers MIX zeigt jedoch die Dosis-Wirkungskurve der durch (-)-Isoproterenol induzierten Änderung des cAMP-Gehalts der Rattenherzzellen die gleiche Konzentrationsabhängigkeit wie die Dosis-Wirkungskurve, die in Abwesenheit des Hemmers bestimmt wurde. Die Verschiebung der Dosis-Wirkungskurve der Zunahme des zellulären cAMP-Gehalts zu höheren Katecholaminkonzentrationen ist demnach nicht auf den Einfluß der Phosphodiesterase zurückzuführen (Abb. 29).

KAUMANN und Mitarbeiter (1976, 1977b) verglichen die positiv inotrope Wirkung von (-)-Isoproterenol an Herzpräparaten mit der Stimulierung der Adenyl-Cyclase-Aktivität isolierter Membranpartikel, deren Rezeptor-Cyclase-Kopplung durch Guanyl-Nukleotide verbessert war und stellten unterschiedliche Konzentrationsabhängigkeiten der beiden Effekte fest. Ein Vergleich unserer Ergebnisse mit den Befunden dieser Arbeit zeigt, daß das Ausmaß der Dissoziation in diesen Versuchen von derselben Größenordnung ist wie in unseren Experimenten.

Tabelle XV: Konzentrationsabhängigkeiten verschiedener Effekte von (-)-Isoproterenol. Vergleich von Ergebnissen, die an verschiedenen Versuchssystemen gewonnen wurden

Dosis-Wirkungskurve des	Versuchssystem	EC ₅₀ (-)-Iso- proterenol	Autoren
positiv inotropen Effekts	Herzgewebe	$\sim 3 \times 10^{-10} \text{ M}$	KAUMANN und Mitarbeiter (1977b)
Adenyl-Cyclase-Aktivität	isolierte Herzmembranen	$\sim 9 \times 10^{-9} \text{ M}$	KAUMANN und Mitarbeiter (1977b)
positiv chronotropen Effekts	kultivierte Zellen	$2.3 \times 10^{-10} \text{ M}$	diese Arbeit
cAMP-Gehalts	kultivierte Zellen	$4.9 \times 10^{-9} \text{ M}$	diese Arbeit

Dieser Vergleich zeigt, daß die Membranpräparationen von KAUMANN und BIRNBAUMER (1973, 1974) bezüglich der Wirkungsübermittlung durch den β -Adrenoceptor den Verhältnissen in der intakten Zelle gleichgesetzt werden können. Allerdings nur, wenn die Rezeptor-Cyclase Kopplung durch Zusatz von Guanyl-Nukleotiden optimiert wurde. Die unterschiedlichen Konzentrationsabhängigkeiten der Dosis-Wirkungskurve des positiv chronotropen Effekts und der Dosis-Wirkungskurve der Änderung des cAMP-Gehalts widersprechen einem einfachen "second messenger" Modell der Übermittlung des positiv chronotropen Effekts von (-)-Isoproterenol mittels cAMP. Will man ein "second messenger"-Konzept aufrechterhalten, muß dieses erweitert werden und zwar so, daß die unterschiedlichen Wirkungsweisen der verschiedenen β -Adrenoceptorliganden erklärt werden können.

4.6 DAS VORHANDENSEIN EINER KATECHOLGRUPPE BEDINGT DIE EIGENSCHAFT EINES β -ADRENOCEPTORLIGANDEN, EFFEKTE ZU INDUZIEREN, OHNE EINE GROSSE ANZAHL REZEPTOREN ZU BESETZEN. EIN VERSUCH DIE UNTERSCHIEDLICHEN WIRKUNGSWEISEN DER VERSCHIEDENEN β -ADRENOCEPTORLIGANDEN ZU KLÄREN

Um zu klären, wie die unterschiedlichen Substituenten der β -Adrenoceptorliganden deren Wirkungsweise beeinflussen, verglichen wir die Effekte, die durch das stickstofflose Propiophenon U-0521 stimuliert werden, mit den Effekten anderer β -Adrenoceptorliganden. U-0521 induziert an kultivierten Rattenherzzellen positiv chronotrope Effekte (Abb. 11, 12). In Abb. 39 ist die durch 1×10^{-4} M U-0521 induzierte Zunahme des cAMP-Gehalts der kultivierten Rattenherzzellen dargestellt. Die Kinetik zeigt eine ähnliche Charakteristik wie diejenige, die durch 1×10^{-9} M (-)-Isoproterenol induziert wird (KAUMANN und Mitarbeiter, 1977a).

Positiv chronotrope Effekte von U-0521 wurden bereits von TRENDELENBURG (1971) beobachtet. Die Autoren vermuteten, daß die Effekte durch den β -Adrenoceptor vermittelt wurden (TRENDELENBURG und Mitarbeiter, 1971; WÖPPEL und TRENDELENBURG, 1973). Wir konnten darüberhinaus zeigen, daß der β -Adrenoceptor-blocker (-)-Bupranolol sowohl den positiv chronotropen Effekt (Tabelle XVI) als auch die Zunahme des cAMP-Gehalts (Tabelle XII), die durch das Propiophenon bewirkt werden, hemmt. Da der positiv chronotrope Effekt von U-0521 auf ähnliche Weise wie die Effekte von (-)-Isoproterenol und (-)-DCI durch (-)-Bupranolol gehemmt werden (Tabelle XVI), ist bewiesen, daß auch die Effekte des Propiophenons über β -Adrenoceptoren vermittelt werden. Dieses Ergebnis zeigt, daß die Stickstoffgruppe der Katecholamine für die Eigenschaft der β -Adrenoceptorliganden, positiv chronotrope Effekte zu übermitteln, nicht wesentlich ist.

Um weitere Aufschlüsse über die Wirkungsweise des stickstofflosen β -Adrenoceptorliganden zu erhalten, untersuchten KAUMANN und Mitarbeiter (1977a) den positiv chronotropen Effekt von U-0521 an rechten Vorhöfen der Ratte. Dabei stellten wir fest, daß die Wirkung von U-0521 und (-)-Isoproterenol nach Ausschalten der extraneuronalen Aufnahme additiv ist. Das bedeutet, daß U-0521 Effekte induziert, indem es wenige β -Adrenoceptoren besetzt. An Membranpartikeln, die aus Katzenherzen präpariert waren, kann eine Hemmung der von (-)-Isoproterenol stimulierten cAMP-Produktion durch U-0521 festgestellt werden (KAUMANN und Mitarbeiter, 1977a). Aus dem Ausmaß der Hemmung kann geschlossen werden, daß U-0521 in maximal wirksamer Konzentration Effekte auslöst, indem es weniger als 7% der verfügbaren β -Adrenoceptoren besetzt. Ferner weisen diese Ergebnisse darauf hin, daß U-0521 eine geringe Affinität zum β -Adrenoceptor besitzt (Affinitätskonstante wahrscheinlich $<10^4$).

Da U-0521, ähnlich Isoproterenol, Effekte induziert, indem es wenige Rezeptoren besetzt, jedoch andererseits eine geringe Affinität zum β -Adrenoceptor zeigt, schliessen wir, daß die

Stickstoffgruppierung der β -Adrenoceptorliganden im Wesentlichen für die Affinitäten der Substanzen zum Rezeptor verantwortlich ist. Die Katecholgruppierung hätte nur einen geringen Einfluß auf die Affinitätseigenschaften der Liganden. In diesem Fall sollte die Affinität von (-)-DCI zum β -Adrenoceptor (5×10^7 M) ähnlich der Affinität von Isoproterenol zum β -Adrenoceptor sein, denn die Substanzen unterscheiden sich nur durch eine Substitution der Katechol-Hydroxygruppen durch Chlor.

Affinitäten von Katecholaminen zum Herz- β -Adrenoceptor sind noch nicht bekannt. Jedoch konnte an Vogelerythrozyten eine Affinität von (-)-Isoproterenol zum β -Adrenoceptor von ungefähr 10^7 M^{-1} bestimmt werden (ATLAS und Mitarbeiter, 1974; BROWN und Mitarbeiter, 1976). Es ist jedoch wahrscheinlich, daß die Affinität von (-)-Isoproterenol zum Herz- β -Adrenoceptor von der gleichen Größenordnung ist wie die zum Vogelerythrozyten- β -Adrenoceptor, also $\sim 10^7 \text{ M}^{-1}$. Für diese Vermutung spricht die Tatsache, daß die apparenten Dissoziationskonstanten, die anhand der Hemmung der durch (-)-Isoproterenol induzierten Effekte für verschiedene Liganden und den β -Adrenoceptor an Herzgeweben (KAUMANN und Mitarbeiter, 1977b) und an Vogelerythrozyten (ATLAS und Mitarbeiter, 1974) bestimmt wurden, ähnlich sind.

Demnach wären die Affinitätskonstanten von (-)-DCI zum β -Adrenoceptor ($5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$) und von (-)-Isoproterenol zum β -Adrenoceptor ($\sim 10^7 \text{ M}^{-1}$) in etwa von der gleichen Größenordnung. Die Substituenten am Aromaten würden also keinen ausgeprägten Einfluß auf die Affinität des Liganden zum β -Adrenoceptor ausüben.

Ein weiterer Grund für die geringe Affinität des Propiophenons zum β -Adrenoceptor könnte das Vorhandensein der Ketogruppe sein. Durch mesomere Wechselwirkung mit dem Aromaten ist die Ketogruppe wahrscheinlich koplanar zu dem Ring angeordnet. Dadurch ist das Molekül weniger flexibel als ein Katecholaminmolekül und kann sich eventuell dem Rezeptor nicht optimal nähern.

Die Ergebnisse legen die Vermutung nahe, daß U-0521 auf die gleiche Weise wie volle Agonisten Effekte induziert. Die folgende Beobachtung erschwert jedoch eine eindeutige Aussage. Volle Agonisten induzieren genau das gleiche Ausmaß des Maximaleffekts. Der Maximaleffekt von U-0521 kann jedoch durch Zugabe von (-)-Isoproterenol erhöht werden. Da U-0521 in höheren Konzentrationen toxisch wirkt, könnte es möglich sein, daß der von uns festgestellte maximale positiv chronotrope Effekt eine Addition eines depressiven und eines stimulierenden Effekts widerspiegelt und ein echtes Maximum der Wirkung von U-0521 überhaupt nicht erreicht werden kann.

Diese Schlußfolgerungen bekräftigen folgende Annahmen:

- a) Das Vorhandensein einer Katecholgruppe bedingt, daß ein Ligand Effekte induziert, ohne eine große Anzahl der β -Adrenoceptoren zu besetzen.
- b) Die Stickstoffgruppierung ist für die Affinität des Liganden zum β -Adrenoceptor wesentlich.

Ein Modell, das davon ausgeht, cAMP sei "second messenger" bei der Übermittlung der Effekte der β -Adrenoceptorliganden, muß demnach folgende Tatsachen in Rechnung stellen:

- 1) β -Adrenoceptorliganden, die Katecholgruppen enthalten, stimulieren positiv chronotrope Effekte, indem sie nur wenige Rezeptoren besetzen.
- 2) Die Dosis-Wirkungskurve der durch (-)-Isoproterenol stimulierten Zunahme des cAMP-Gehalts ist verglichen mit der Konzentrationsabhängigkeit des positiv chronotropen Effekts zu 20 Mal höheren Katecholaminkonzentrationen verschoben.
- 3) (-)-DCI induziert dagegen proportional der anteiligen Rezeptorbesetzung positiv chronotrope Effekte und eine Erhöhung des cAMP-Gehalts.
- 4) Die Stimulierung des cAMP-Gehalts durch (-)-DCI kann nur nach Hemmung der Phosphodiesterase festgestellt werden.

- 5) Ebenso kann eine Stimulierung des cAMP-Gehalts durch (-)-Isoproterenol nur nach Hemmung der Phosphodiesterase festgestellt werden, wenn man Testkonzentrationen einsetzt, die kleinere als halbmaximale positiv chronotrope Effekte induzieren.
- 6) Die Kinetiken der durch (-)-Isoproterenol und der durch (-)-DCI stimulierten Zunahme des zellulären cAMP-Gehalts unterscheiden sich in ihrem Verlauf.
- 7) (-)-Isoproterenol induziert unter ähnlichen Versuchsbedingungen eine mehr als fünf Mal so starke maximale Zunahme des zellulären cAMP-Gehalts verglichen mit (-)-DCI. Demgegenüber verursacht (-)-Isoproterenol nur einen 1.6-fachen maximalen positiv chronotropen Effekt verglichen mit (-)-DCI.

Das folgende hypothetische Modell der Wirkungsweise der Katecholamine würde den Forderungen entsprechen; dabei gehen wir von einem Funktionsmechanismus ähnlich dem, der in Modell V beschrieben wurde, aus. Bei gleicher Rezeptorbesetzung würden Katechole deshalb stärkere positiv chronotrope Wirkungen hervorrufen als z.B. (-)-DCI, da das umwandelnde System (UW) in Gegenwart von Katecholen durch das stimulierende Kompartiment (S_K) stärker aktiviert würde und dadurch mehr Umwandlungsprodukt (X) für eine Stimulierung der Ionenkanäle zur Verfügung stünde. Katecholamine könnten deshalb schon bei verhältnismäßig geringer Stimulation der Adenylyl-Cyclase einen relativ starken positiv chronotropen Effekt induzieren. Auf diese Weise könnte eine "second messenger" Wirkung des cAMP trotz Dissoziation der Dosis-Wirkungskurve des positiv chronotropen Effekts von Katecholaminen und der Dosis-Wirkungskurve der cAMP-Produktion verstanden werden.

4.7 DIE ISOLIERTE KULTIVIERTE HERZZELLE STELLT EIN VOR- TEILHAFTES VERSUCHSSYSTEM ZUM STUDIUM VON REAKTIONEN DAR, DIE ÜBER DEN β -ADRENOCCEPTOR VERMITTELT WERDEN

Sowohl die Entwicklung der Zellkulturen als auch ihr physiologisches Verhalten ist von den Präparations- und Kultivationsbedingungen abhängig. Es ist deshalb notwendig, zusätzlich neben der Untersuchung der Wirkungsweise der Katecholamine das Versuchssystem genau zu charakterisieren.

Zwei morphologisch verschiedene Zelltypen wurden von allen Autoren, die sich mit kultivierten Herzzellen befaßten, beobachtet. Die von uns in Anlehnung an MARK und STRASSER (1966) als stark konturierte Zellen beschriebenen Zelltypen sind zu spontanen rhythmischen Kontraktionen fähig und werden deshalb mit Muskelzellen gleichgesetzt. Der andere Zelltyp ist flach, konturlos und nicht kontraktile. Dieser Typ wird meist als fibroblastenartige Zelle bezeichnet. Diese Zellen können aus Bindegewebsanteilen des Herzens, aus Endothelien (endothelioid cells: MARK und STRASSER, 1966) oder von degenerierten Myoblasten abstammen. Die Entwicklung der einzelnen Zelltypen im Laufe der Kultivation wird von allen Autoren bei Zellen verschiedener Tierarten recht ähnlich beschrieben. Unterschiedliche Angaben treten nur im Verhältnis schlagender zu nicht schlagenden Zellen, sowie zum Verhältnis Muskelzellen zu fibroblastenartigen Zellen, auf.

Eine eindeutige Aussage, zu welchem Zelltyp eine bestimmte nicht schlagende Zelle gehört, ist nach unserer Meinung ohne elektronenmikroskopische Aufnahmen oder elektrophysiologische Untersuchungen nicht möglich, da im Lichtmikroskop die Unterschiede zwischen beiden Zelltypen fließend erscheinen (Abb. 8). So kann man bei längerer Beobachtung feststellen, daß Zellen, die zuerst als "nicht schlagende" identifiziert waren, sich plötzlich kontrahieren. Außerdem kann man beobachten, daß eine strukturell fibroblastenähnliche Zelle

spontan und regelmäßig zu schlagen beginnt. Bei kultivierten Hühnerherzzellen läßt sich ein großer Teil der nicht spontan schlagenden Zellen durch elektrische Reizung zur Kontraktion anregen (KAUFMANN und Mitarbeiter, 1969).

Diese Tatsachen weisen darauf hin, daß der prozentuale Anteil von pulsierenden Zellen kein sicheres Maß für die Anzahl der Muskelzellen in einer Zellkultur ist. Die von uns angegebenen Zahlenverhältnisse zwischen Muskelzellen und Fibroblasten fallen deshalb zu ungunsten des Muskelzellanteils aus. Aus diesem Grund erscheint es uns gerechtfertigt, aus Versuchen, die an Zellkulturen mit 80% Muskelzellen gewonnen wurden, Rückschlüsse auf Zusammenhänge zwischen cAMP-Gehalt und Funktion der Herzzelle zu ziehen, da der Muskelzellanteil wahrscheinlich größer ist.

Für unterschiedliche Ergebnisse verschiedener Autoren können die Speziesunterschiede der verwendeten Tierarten, sowie methodische Unterschiede bei Zellpräparation und Kultivation verantwortlich sein. Eigene Beobachtungen bei der Präparation von Rattenherzzellen weisen darauf hin, daß ein zu langer Kontakt der Zellen mit Trypsin nicht nur mehr Zellbruchstücke auftreten läßt, sondern auch den Fibroblastenanteil der Kultur vergrößert.

Katzenherzzellen lassen sich durch 0.125% Trypsin nur schwer aus dem Gewebeverband lösen. Sie bleiben deshalb länger in Kontakt mit dem Enzym. Es ist auffällig, daß gerade bei diesen Zellen der Prozentsatz der schlagenden Zellen sehr gering ist. Hühnerherzzellen sind, verglichen mit Rattenherzzellen, sehr empfindlich gegenüber Trypsinbehandlung. Es gelang uns auch nach Abkürzen der Inkubationszeit nicht, einen ebenso großen Anteil schlagender Zellen zu erhalten wie bei der Präparation von Rattenherzzellen. Dieser Befund deckt sich mit den Ergebnissen von DE HAAN (1967a), der ein defi-

niertes Trypsinierungsprogramm für Herzzellen von Hühnerembryonen entsprechend ihrem jeweiligen Alter ausgearbeitet hat, und höchstens 50% schlagende Zellen in der Kultur vorfand.

Es wäre deshalb durchaus denkbar, daß das Ausbleiben eines durch Katecholamine induzierbaren positiv chronotropen Effekts bei den Experimenten von KAUFMANN und Mitarbeitern (1969) eher auf eine zu starke Schädigung der Membransysteme und nicht auf eine Schädigung des β -Adrenoceptors zurückzuführen ist. Diese Vermutung wird durch unsere bereits diskutierten Beobachtungen über die Reaktivität der kultivierten Hühnerherzzellen auf Katecholaminstimulierung bestärkt.

Ein weiterer, erstaunlicher Befund bleibt zu klären: Setzt man bei Kultivationsbeginn eine große Zelldichte ($3-5 \times 10^5$ Zellen/Kultur) ein, ist nach drei Tagen der prozentuale Anteil der Myoblasten größer als in den Kulturen, die mit weniger Zellen beschickt wurden. Da Fibroblasten gegenüber Myoblasten eine höhere Teilungsaktivität besitzen, sollte sich bei einem anfänglich niedrigen Fibroblastenanteil im Laufe der Kultivation eher das Verhältnis zugunsten dieser nicht kontraktile Zellen ändern. Dies ist auch bei Kulturen zu erkennen, in welchen zu Kultivationsbeginn $1-2 \times 10^5$ Zellen eingesetzt wurden. Die hohe Zahl von Myoblasten in zellreichen Kulturen läßt sich eventuell folgendermaßen erklären: Nach einigen Tagen bildet sich ein Zellrasen aus. In dem Zellrasen nimmt die Teilungsaktivität aller Zellen ab (RINALDINI, 1954; STOKER, 1967; BURGER, 1970). Hat man hohe Zelldichten zur Kultivation eingesetzt, bleibt, da ein geschlossener Zellrasen früher ausgebildet ist, der anfänglich hohe prozentuale Anteil an Muskelzellen erhalten. KONIGSBERG (1971) konnte für fusionierende Skelettmuskelzellen beweisen, daß eine größere Anzahl Myoblasten durch Abgabe von Substanzen ins Medium ein "microenvironment" erzeugt, welches die Zellfusion begünstigt. Ein ähnlicher

Konditionierungseffekt könnte auch in Herzmuskelzellkulturen die Lebensbedingungen für Muskelzellen verbessern (GORDON und WILDE, 1965).

Im intakten Herzgewebe zeigt nur ein geringer Anteil der Zellen Spontanaktivität. In den Zellkulturen ist dagegen ein hoher Prozentsatz der Zellen spontan aktiv (50-80% bei Rattenherzzellkulturen am 2. Tag der Kultivation). WOLLENBERGER (1964) zeigt auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen, daß durch Trypsinbehandlung die organisierte myofibrilläre Struktur der Ventrikelzelle zerstört wird. Er nimmt an, daß die Zelle dabei eine rückläufige Entwicklung durchmacht, um ein Stadium zu erreichen, in welchem sie fähig ist, autorhythmisch tätig zu werden. Vergleiche der Morphologie kultivierter Herzzellen mit anderen spontan aktiven Zellen, wie Schrittmacherzellen des Herzens und Muskelzellen der glatten Muskulatur, legen den Schluß nahe, daß es sich bei diesen autorhythmisch tätigen Zellen um in ihrer Entwicklung primitive Zellen handelt, deren Membranpotential nicht stabilisiert ist.

Ein weiteres Indiz für eine "trypsin-induzierte" Rückdifferenzierung der kultivierten Herzzelle geben Versuche, in welchen die Entwicklung von Membraneigenschaften während der Embryogenese mit den Membraneigenschaften von kultivierten Herzzellen verglichen werden. Herzen von jungen Hühnerembryonen besitzen noch keinen mittels TTX hemmbaren schnellen Na^+ -Kanal (SPERELAKIS und SHIGENOBU, 1972; SHIGENOBU und SPERELAKIS, 1971). Monolayer-Herzzellkulturen von Hühnchen sind im Gegensatz zu gleichaltrigen Herzen für 10^{-5} g/ml TTX unempfindlich (McDONALD und SACHS, 1974). Eine TTX-Unempfindlichkeit konnte auch in unserem Labor an kultivierten Rattenherzzellen nachgewiesen werden (SCHWAMBORN und Mitarbeiter, 1976).

Zusammenfassend läßt sich feststellen: Isolierte kultivierte Herzzellen stellen wegen ihrer Unabhängigkeit von syncytialen Einflüssen, der Abwesenheit von Nervenzellen, der genauen Kontrollierbarkeit ihres äußeren Milieus ein vorteilhaftes Studienobjekt auf der Ebene der Einzelzelle dar. Die Entwicklung der Kulturen ist jedoch von der verwendeten Tierart, dem Präparationsverfahren und den Kultivationsbedingungen abhängig. Dies mag zu unterschiedlichen Ergebnissen einzelner Autoren führen. Andererseits bietet sich hier wiederum eine Chance, diese Unterschiede zu untersuchen, um dadurch einen Einblick in den zellulären Funktionsmechanismus zu erhalten.

Wir betrachteten bei unseren Untersuchungen einen Aspekt aus dem komplexen System der Herzzelle, nämlich Reaktionen, die über den β -Adrenoceptor vermittelt werden. Dabei zeigen unsere Ergebnisse deutlich, daß die kultivierte isolierte Herzzelle auf einen Katecholaminstimulus ähnlich den Zellen im intakten Organ reagiert.

Außerdem ist es möglich an den kultivierten Zellen die Kinetiken der Katecholamineffekte zu untersuchen. Dadurch sind wir in der Lage, einen unterschiedlichen Wirkungsmechanismus verschiedener Liganden zu erkennen. Die kultivierte Herzzelle bietet dem Experimentator einen intakten β -Adrenoceptor, der frei zugänglich ist und stellt deshalb ein vorteilhaftes Versuchssystem dar.

Überlegungen zu weiteren Untersuchungen

Unsere Ergebnisse erlauben keine eindeutige Auskunft darüber, ob cAMP als "second messenger" für den durch β -Adrenoceptorliganden induzierten positiv chronotropen Effekt fungiert. Die Resultate sind jedoch richtungsweisend für weitere Untersuchungen über die Wirkungsweise von β -Adrenoceptorliganden.

- a) Ein aufschlußreiches Experiment wäre die Bestimmung von Affinitätskonstanten zwischen (-)-Isoproterenol und dem β -Adrenoceptor. Versuche von KAUMANN und WITTMANN an kultivierten Rattenherzzellen, die Affinität von (-)-Isoproterenol zum β -Adrenoceptor durch Verdrängen von radioaktiv markiertem Dihydroxyalprenolol zu bestimmen, ergaben als vorläufiges Resultat eine Affinität von (-)-Isoproterenol zum β -Adrenoceptor zwischen 10^7 und 10^8 M^{-1} . Dieses Ergebnis unterstützt die diskutierte Annahme, daß (-)-Isoproterenol positiv chronotrope Effekte induziert, indem es nur wenige Rezeptoren besetzt. Eine unterschiedliche Wirkungsweise von vollen und partiellen Agonisten ist deshalb sehr wahrscheinlich.
- b) Gilt das "second messenger"-Konzept, so fordern unsere Ergebnisse eine enge Kompartimentierung zwischen Adenylyl-Cyclase und dem funktionsvermittelnden System. Eine direkte Messung der Adenylyl-Cyclase Aktivität sollte gerade bei einer in unserem Fall zu erwartenden engen räumlichen Kompartimentierung zwischen Adenylyl-Cyclase und funktionsübermittelndem Kompartiment am ehesten Aufschluß über die Rolle des cAMP bei Reaktionen, die über den β -Adrenoceptor vermittelt werden, geben.
- c) In unseren Versuchen wurde eine Dissoziation der durch (-)-Isoproterenol stimulierten Dosis-Abhängigkeiten des positiv chronotropen Effekts und der Zunahme des cAMP Gehalts festgestellt. Eine wesentliche Frage ist: Bleibt diese unterschiedliche Konzentrationsabhängigkeit bestehen, wenn die Adenylyl-Cyclase-Aktivität direkt als Meßparameter verwendet wird? Blicke die unterschiedliche Konzentrationsabhängigkeit erhalten, wäre es interessant festzustellen, ob die Rezeptorbesetzung der β -Adrenoceptoren durch (-)-Isoproterenol die gleiche Konzentrationsabhängigkeit wie die Stimulierung der Adenylyl-Cyclase-Aktivität zeigte. Ein getrennter Verlauf der Dosis-Abhängigkeit des positiv chronotropen und positiv inotropen Effekts der Katecholamine von der Dosis-Abhängigkeit der Zunahme des cAMP-Gehalts wird auch von anderen

Autoren berichtet (KAUMANN und Mitarbeiter, 1976, 1977b; SHANFELD und Mitarbeiter, 1969; BENFEY, 1971). Jedoch beschrieben JUNGBLUTH und Mitarbeiter (1976) eine Übereinstimmung der genannten Dosis-Abhängigkeiten. Diese unterschiedlichen Resultate könnten eventuell auf die Verwendung unterschiedlicher Versuchstierarten bei den einzelnen Untersuchungen zurückzuführen sein.

- d) Weitere Untersuchungen über die ionalen Vorgänge bei der elektrischen Erregung der Herzzellmembran und ihre Beeinflussung durch cAMP könnten ebenfalls dazu beitragen, weitere, tiefergehende Erkenntnisse über die molekularen Zusammenhänge bei der Übermittlung der Effekte der Katecholamine zu erlangen.

5. Z U S A M M E N F A S S U N G

=====

An kultivierten Herzzellen verschiedener Tierarten (Rattenherzzellen, Hühnerherzzellen, Katzenherzzellen) wurden Effekte verschiedener β -Adrenoceptorliganden (Isoproterenol, Dichloroisoproterenol, Noradrenalin, 3',4'-Dihydroxy- β -Methylpropio-phenon) auf die Spontanaktivität und den cAMP-Gehalt untersucht.

- 1) Dabei zeigte sich, daß die isolierte, kultivierte Herzmuskelzelle ein geeignetes Versuchssystem ist, um den Mechanismus β -Adrenoceptor-vermittelter Reaktionen zu studieren. Dafür sprechen folgende Befunde:
 - a) Die Störeinflüsse, die im Herzgewebepräparat die Konzentration der β -Adrenoceptorliganden am Rezeptor beeinträchtigen, wirken sich bei Untersuchungen an kultivierten Zellen nicht wesentlich aus.
 - b) Die β -Adrenoceptoren der kultivierten Herzmuskelzellen besitzen die gleichen Affinitätseigenschaften wie die Rezeptoren des intakten Gewebes.
 - c) Kinetiken der Effekte der β -Adrenoceptorliganden können an kultivierten Herzzellen bestimmt werden, da die Substanzen keine langen Diffusionsstrecken überwinden müssen, um den Rezeptor zu erreichen.

Aus den Ergebnissen dieser Untersuchungen konnte ferner folgendes geschlossen werden:

- 2) Die von β -Adrenoceptorliganden induzierten positiv chronotropen Effekte sowie die Änderung des cAMP-Gehalts werden von β -Adrenoceptoren mit gleichen Affinitätseigenschaften übermittelt.
- 3) Der Vergleich der Kinetiken der Änderung des zellulären cAMP-Gehalts legt den Schluß nahe, daß die Übermittlung der von (-)-Dichloroisoproterenol und von (-)-Isoproterenol induzierten Effekte durch unterschiedliche Reaktionsmechanismen erfolgt.
- 4) Untersuchungen der β -Adrenoceptor-vermittelten Effekte des 3',4'-Dihydroxy- β -Methylpropiophenon (U-0521) weisen darauf hin, daß die Katecholgruppe für die Eigenschaft bestimmter

β -Adrenoceptorliganden verantwortlich ist, maximale Effekte zu induzieren, wobei sie nur wenige Rezeptoren einer Zelle besetzen.

- 5) Der partielle Agonist (-)-Dichloroisoproterenol induziert an kultivierten Rattenherzzellen positiv chronotrope Effekte proportional der fraktionellen Rezeptorbesetzung der β -Adrenoceptoren. Die Dosis-Wirkungskurve der Änderung des cAMP-Gehalts, die durch (-)-Dichloroisoproterenol induziert ist, zeigt annähernd den gleichen Verlauf wie die fraktionelle Rezeptorbesetzungskurve und die Dosis-Wirkungskurve des positiv chronotropen Effekts. Diese annähernde Übereinstimmung läßt sich mit dem Konzept vereinbaren, cAMP sei "second messenger" bei der Übermittlung des positiv chronotropen Effekts.
- 6) Die Dosis-Wirkungskurve der durch (-)-Isoproterenol induzierten Zunahme des cAMP-Gehalts von Rattenherzzellkulturen ist gegenüber der Dosis-Wirkungskurve des positiv chronotropen Effekts zu höheren Katecholaminkonzentrationen verschoben. Dieser Befund spricht ebenfalls dafür, daß der Reaktionsmechanismus bei der Übermittlung der von (-)-Isoproterenol induzierten Effekte verschieden von dem Mechanismus ist, der für die Übermittlung der Effekte von (-)-Dichloroisoproterenol verantwortlich ist.
- 7) Ein "second messenger"-Modell, bei dem cAMP der intrazelluläre Vermittler der Katecholamineffekte ist, gilt demnach nur unter folgenden Einschränkungen:
 - a) Das Kompartiment, welches den positiv chronotropen Effekt vermittelt, liegt räumlich eng benachbart zur Adenylatcyclase.
 - b) Für die Übermittlung der von (-)-Isoproterenol induzierten Effekte muß ein kooperativer Mechanismus gefordert werden.
- 8) (-)-Isoproterenol induziert an kultivierten Hühnerherzzellen keinen positiv chronotropen Effekt. Jedoch kann nachgewiesen werden, daß β -Adrenoceptoren vorhanden sind, die eine Zunahme des zellulären cAMP Gehalts nach Katecholaminstimulus vermitteln. Die Unempfindlichkeit des chronotropen Mechanismus der kultivierten Hühnerherzzellen gegenüber (-)-Isoproterenol ist deshalb nicht auf eine Beschädigung der β -Adrenoceptoren bei der Präparation zurückzuführen.

6. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

=====

- 1) AHLQUIST, R.P. (1948):
A study of the adrenotropic receptors.
Amer. J. Physiol. 153, 586-600
- 2) ARIENS, E.J. (1966):
Receptor theory and structure-action relationship.
Adv. Drug Res. 3, 235-285
- 3) ARUNLAKSHANA, O., SCHILD, H.O. (1959):
Some quantitative use of drug antagonists.
Brit. J. Pharmacol. 14, 48-58
- 4) ATLAS, D., STEER, M.L., LEVITZKI, A. (1974):
Stereospecific binding of propranolol and catecholamines
to the β -adrenergic receptor.
Proc. Nat. Acad. Sci. 71, 4246-4248
- 5) AXELROD, J. (1966):
Methylation reactions in the formation and metabolism of
catecholamines and other biogenic amines.
Pharmacol. Rev. 18, 95-113
- 6) BARRET, A.M., CARTER, J. (1970):
Comparative chronotropic activity of β -adrenoceptive anta-
gonists.
Brit. J. Pharmacol. 40, 373-381
- 7) BARRY, W.H., PITZEN, R., PROTAS, K., HARRISON, D.C. (1975):
Inotropic effects of different calcium ion concentrations
on the embryonic chick ventricle.
Circ. Res. 36, 727-734
- 8) BENFEY, B.G. (1971):
Lack of relationship between myocardial cyclic AMP concen-
trations and inotropic effects of sympathomimetic amines.
Brit. J. Pharmacol. 43, 757-763
- 9) BIRNBAUMER, L. (1973):
Hormone sensitive adenyl cyclases: useful models for study-
ing hormone receptor functions in cell-free systems.
Biochim. Biophys. Acta 300, 129-158
- 10) BIRNBAUMER, L., POHL, S.L., KAUMANN, A.J. (1974):
Receptors and acceptors: a necessary distinction in hormone
binding studies.
Advances in Cyclic Nucleotide Research (ed: Greengard, P.
and Robinson, G.A.) Raven Press N.Y., Vol. 4, 239-281

- 11) BLINKS, J.R., OLSON, C.B., JEWELL, B.R., BRAVENY, P. (1972):
Influence of caffeine and other methylxanthines on mechanical properties of isolated mammalian heart muscle.
Circ. Res. 30, 367-392
- 12) BODER, G.B., JOHNSON, I.S. (1972):
Comparative effects of some cardioactive agents on automaticity of cultured heart cells.
J. Mol. Cell. Cardiol. 4, 453-463
- 13) BROWN, B.L., ALBANO, D.M., EKINS, R.P., SGHERZI, A.M. (1971):
A simple and sensitive method of the measurement of adenosine 3':5' monophosphate.
Biochem. J. 121, 561-562
- 14) BROWN, E.M., RODBARD, D., FEDAK, J.A., WOODART, C.J., AURBACH, G.D. (1976):
 β -adrenergic receptor interactions.
J. Biol. Chem. 251, 1239-1246
- 15) BURGER, M.M. (1970):
Proteolytic enzymes initiating cell division and escape from contact inhibition of growth.
Nature 227, 170-171
- 16) BURROWS, M.T. (1912):
Rhythmische Kontraktionen der isolierten Herzmuskelzelle außerhalb des Organismus.
Münchener Med. Wschr. 27, 1473-1475
- 17) BUTCHER, R.W., BAIRD, C.E. (1968):
Effects of prostaglandins on adenosine 3',5' monophosphate levels in fat and other tissues.
J. Biol. Chem. 243, 1713-1717
- 18) BUTCHER, R.W., BAIRD, C.E., SUTHERLAND, E.W. (1968):
Effects of lipolytic and antilipolytic substances on adenosine 3',5' monophosphate levels in isolated fat cells.
J. Biol. Chem. 243, 1705-1712
- 19) BUTCHER, R.W., SUTHERLAND, E.W. (1962):
Adenosine 3',5'-phosphate in biological materials.
I. Purification and properties of cyclic 3',5' nucleotide phosphodiesterase and use of this enzyme to characterize adenosine 3',5'-phosphate in human urine.
J. Biol. Chem. 237, 1244-1250
- 20) CALLINGHAM, B.A., BURGEN, A.S.V. (1966):
Uptake of isoprenaline by the perfused rat heart.
Mol. Pharmacol. 2, 37-42
- 21) CAVANAUGH, M.W. (1955):
Pulsation, migration and division in dissociated chick embryo heart cells in vitro.
J. Exp. Zool. 128, 573-585

- 22) CHANG, T.D., CUMMING, G.R. (1972):
Chronotropic responses of human heart tissue cultures.
Circ. Res. 30, 628-633
- 23) CHLAPOWSKI, F.J., KELLY, L.A., BUTCHER, R.W. (1975):
Cyclic nucleotides in cultured cells.
Advances in Cyclic Nucleotide Research (ed: Greengard, P.
and Robinson, G.A.) Raven Press N.Y., vol. 6, 245-338
- 24) CLARK, A.J. (1926):
The relation between acetyl choline and muscle cells.
J. Physiol. 61, 530-546
- 25) CLARK, A.J. (1926):
The antagonism of acetyl choline by atropin.
J. Physiol. 61, 547-556
- 26) CLARK, R.B., PERKINS, J.P. (1971):
Regulation of adenosine 3',5'-cyclic monophosphate concentration in cultured human astrocytoma cells by catecholamines and histamine.
Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 68, 2757-2760
- 27) CLARK, R.B., SU, Y.-F., ORTMANN, R., CUBEDDU, L., JOHNSON, G.L.
PERKINS, J.P. (1975):
Factors influencing the effect of hormones on the accumulation of cyclic AMP in cultured human astrocytoma cells.
Metabolism 24, 343-358
- 28) DAVOREN, P.R., SUTHERLAND, E.W. (1963):
The cellular location of adenylyl cyclase in the pigeon erythrocyte.
J. Biol. Chem. 238, 3016-3023
- 29) DE HAAN, R.L. (1967a):
Spontaneous activity of cultured heart cells.
In: Factors Influencing Myocardial Contractility (ed: Tanz, R.D., Kavalier, F., Roberts, J.) Academic Press, New York - London, pp. 217-230
- 30) DE HAAN, R.L. (1967b):
Regulation of spontaneous activity and growth of embryonic chick heart in tissue culture.
Developmental Biol. 16, 216-249
- 31) DE HAAN, R.L., HIRAKOW, R. (1972):
Synchronisation of pulsation rates in isolated cardiac myocytes.
Exp. Cell Res. 70, 214-220
- 32) DE HAAN, R.L., SACHS, H.G. (1972):
Cell coupling in developing systems: the heart cell paradigm.
Curr. Topics in Develop. Biol. 7, 193-228

- 33) DHALLA, N.S. (1967):
Mechanisms of sympathomimetic effects of dichloroisoproterenol: comparison with tyramine, nicotine and norepinephrine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 157, 135-142
- 34) ERTEL, R.J., CLARKE, D.E., CHAO, J.D., FRANKE, F.R. (1971):
Autonomic receptor mechanisms in embryonic chick myocardial cell cultures. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 178, 73-80
- 35) FURCHGOTT, R.F. (1955):
The pharmacology of vascular smooth muscle. *Pharmacol. Rev.* 7, 183-265
- 36) FURCHGOTT, R.F., BURSZTYN, P. (1968):
Comparison of dissociation constants and of relative efficacies of selected agonists acting on parasympathetic receptors. *Proc. N.Y. Acad. Sci.* 144, 882-898
- 37) FURCHGOTT, R.F., KIRPEKAR, S.M., RIEKER, M., SCHWAB, A. (1964):
Actions and interactions of norepinephrine, tyramine and cocaine on aortic strips of rabbit and left atria of guinea pig and cat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 142, 39-58
- 38) GADDUM, J.H. (1926):
The action of adrenaline and ergotamine on the uterus of the rabbit. *J. Physiol.* 61, 141-150
- 39) GADDUM, J.H., HAMEED, K.A., HATHAWAY, D.E., STEPHENS, F.F. (1955):
Quantitative studies of antagonists for 5-hydroxy-tryptamine. *Quart. J. Exp. Physiol.* 40, 49-74
- 40) GAROFOLINI, L. (1927):
Rhythmical contractions of single heart muscle cells in tissue culture in vitro. *J. Physiol.* 63, Proceedings of the Physiological Society v-ix
- 41) GILES, R.E., MILLER, J.W. (1967a):
A comparison of certain properties of catechol-O-methyltransferase to those of adrenergic beta receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 156, 201-206
- 42) GILES, R.E., MILLER, J.W. (1967b):
Studies on the potentiation of the inotropic actions of certain catecholamines by U-0521 (3',4'-dihydroxy- β -methyl-propiofenone). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 157, 55-61

- 43) GILMAN, A.G. (1970):
A protein binding assay for adenosine 3',5' cyclic mono-phosphate.
Proc. Nat. Acad. Sci. 67, 305-312
- 44) GILMAN, A.G. (1974):
Effect of 2-Cl-adenosine on cyclic AMP concentration of cultures cells.
Fed. Proc. 33, 507-518
- 45) GORDON, H.P., WILDE, Ch.E. (1965):
"Conditioned" medium and heart muscle differentiation contrast between explants and disaggregated cells in chemically defined medium.
Exp. Cell Res. 40, 438-442
- 46) GOSHIMA, K. (1970):
Formation of nexuses and electric transmission between myocardial and FL-cells in monolayer cultures.
Exp. Cell Res. 63, 124-130
- 47) GOSHIMA, K. (1973):
A study on the preservation of the beating rhythm of single myocardial cells in vitro.
Exp. Cell Res. 80, 432-438
- 48) GOSHIMA, K. (1974):
Initiation of beating in quiescent myocardial cells by nor-epinephrine, by contact with beating cells and by electrical stimulation of adjacent FL-cells.
Exp. Cell Res. 84, 223-234
- 49) GOSHIMA, K., TONOMURA, Y. (1969):
Synchronized beating of embryonic myocardial cells mediated by FL-cells in monolayer culture.
Exp. Cell Res. 56, 387-392
- 50) HALLE, W. (1963):
Über die Kultivierung und das Verhalten spontan pulsierender Herzventrikelzellen in semisynthetischen Nährmedien unter in vitro Bedingungen.
Acta Biol. Med. Ger. 10, 387-413
- 51) HALLE, W., WOLLENBERGER, A. (1971):
Myocardial and other muscle cell cultures.
In: Methods in Pharmacology (ed: Schwarz, A.), New York, Meredith Comp., Vol. 1, 171-246
- 52) HARARY, I., FARLEY, B. (1960):
In vitro studies of single isolated beating heart cells.
Science 131, 1674-1675

- 53) HARRISON, D.C., KLEIGER, R.E., MERIGAN, T.C. (1966):
Action of isoproterenol on heart cells in tissue culture.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 124, 122-126
- 54) HARRISON, R.G. (1908):
Embryonic transplantation and development of the nervous
system.
Anat. Rec. 2, 385-410
- 55) HASLAM, R.J., GOLDSTEIN, S. (1974):
Adenosine 3',5'-cyclic monophosphate in young and senescent
human fibroblasts during growth and stationary phase in vitro.
Biochem. J. 144, 253-263
- 56) HO, R.J., SUTHERLAND, E.W. (1971):
Formation and release of a hormone antagonist by rat adipo-
cytes.
J. Biol. Chem. 246, 6822-6827
- 57) HILL, A.V. (1909):
The mode of action of nicotine and curare determined by the
form of the contraction curve and the method of temperature
coefficients.
J. Physiol. 39, 361-373
- 58) IVERSEN, L.L. (1967):
The uptake and storage of noradrenaline in sympathetic nerves.
Cambridge University Press.
- 59) JUNGBLUTH, H., DÖRGES, C., MEINERTZ, T. (1976):
Effects of papaverine and isoprenaline on force of contrac-
tion and cyclic AMP level in isolated guinea pig auricles.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. Suppl. 293, 95
- 60) KAKIUCHI, S., RALL, T.W., McILWAIN, H. (1969):
The effect of electrical stimulation upon the accumulation
of adenosine 3',5'-phosphate in isolated cerebral tissue.
J. Neurochem. 16, 485-491
- 61) KAUFMANN, R., TRITTHART, H., RODENROTH, S., ROST, B. (1969):
Das mechanische und elektrische Verhalten isolierter embryo-
naler Herzmuskelzellen in Zellkulturen.
Pflügers Arch. 311, 25-49
- 62) KAUMANN, A.J. (1970):
Adrenergic receptors in heart muscle: Relations among factors
influencing the sensitivity of cat papillary muscle to cate-
cholamines.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 173, 383-398
- 63) KAUMANN, A.J. (1972):
Potentiation of the effects of isoprenaline and noradrenaline
by hydrocortisone in cat heart muscle.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 273, 134-153

- 64) KAUMANN, A.J. (1973):
Adrenergic receptors of cardiac muscle. Two different mechanisms of β -blockers as partial agonists.
Int. Union of Biochemistry Symposium No. 52
Acta Physiol. Lat. Amer. 23, 235-236
- 65) KAUMANN, A.J. (1977):
Relaxation of heart muscle by catecholamines and by dibutyryl cyclic adenosine 3',5' monophosphate.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 296, 205-215
- 66) KAUMANN, A.J., BIRNBAUMER, L. (1973):
Adrenergic receptors in heart muscle: Similarity of apparent affinities of β -blockers for receptors mediating adenylyl cyclase activity, inotropic and chronotropic effects of catecholamines.
Acta Physiol. Lat. Amer. 23, 619-620
- 67) KAUMANN, A.J., BIRNBAUMER, L. (1974):
Characteristics of the adrenergic receptor coupled to myocardial adenylyl cyclase. Stereospecificity and determination of apparent affinity constants for β -blockers.
J. Biol. Chem. 249, 7874-7885
- 68) KAUMANN, A.J., BIRNBAUMER, L., FRICKE, R.F. (1976):
Improved coupling between β -adrenoceptors and adenylyl cyclase with GMP-P(NH)P: Its relevance to positive inotropic effects of adrenergic ligands.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. Suppl. 239, 88
- 69) KAUMANN, A.J., BIRNBAUMER, L., WITTMANN, R. (1977b):
Heart β -adrenoceptors.
Academic Press New York (eds. B.W. O'Malley and L. Birnbaumer) 1978.
- 70) KAUMANN, A.J., BLINKS, J.R. (1967):
Sympathomimetic and non sympathomimetic stimulant effects of β -adrenergic blocking agents on isolated heart muscle.
Pharmacologist 9, 248
- 71) KAUMANN, A.J., BLINKS, J.R. (1977):
Stimulant and depressant effects of β -adrenoceptor blocking agents on isolated heart muscle.
(in Vorbereitung)
- 72) KAUMANN, A.J., MARANO, M. (1973):
Acerca de la determinación de constantes aparentes de equilibrio K_p entre agonistas parciales y receptores.
Medicina (Buenos Aires) 23, 597-598
- 73) KAUMANN, A.J., WITTMANN, R. (1975):
Apparent equilibrium constants between β -adrenoceptors and a competitive antagonist on a cultures pacemaker cell of mammalian heart.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 287, 23-32

- 74) KAUMANN, A.J., WITTMANN, R., BIRNBAUMER, L., HOPPE, B. (1977a):
Activation of myocardial β -adrenoceptor by a nitrogen-free
low affinity ligand, 3',4'-dihydroxy- β -methylpropiofenone
(U-0521).
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 296, 217-228
- 75) KELLY, L.A., BUTCHER, R.W. (1974):
The effect of epinephrine and prostaglandine E_1 on cyclic
adenosine 3',5'-monophosphate level in WI-38 fibroblasts.
J. Biol. Chem. 249, 3098-3102
- 76) KELLY, L.A., BUTCHER, R.W. (1975):
Studies on cyclic AMP metabolism in human epidermoid carcinoma (H Ep-2) cells.
Metabolism 24, 359-368
- 77) KELLY, L.A., HALL, M.S., BUTCHER, R.W. (1974):
Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate metabolism in normal
and SV 40 transformed WI-38 cells.
J. Biol. Chem. 249, 5182-5187
- 78) KJEKSHUS, J.K., SOBEL, B.E. (1970):
Cyclic AMP and cardiac contractility.
Circulation Suppl. III 41+42, 117
- 79) KJEKSHUS, J.K., HENRY, P.D., SOBEL, B.E. (1971):
Activation of phosphorylase by cyclic AMP without augmentation
of contractility in the perfused guinea pig heart.
Circ. Res. 29, 468-478
- 80) KONIGSBERG, I.R. (1971):
Diffusion-mediated control of myoblast fusion.
Developmental Biol. 26, 133-152
- 81) KRAUSE, E.-G., HALLE, W., KALLABIS, E., WOLLENBERGER, A.
(1970):
Positive chronotropic response of cultured isolated rat heart
cells to $N^6,2'$ -O-dibutyryl 3',5' adenosine monophosphate.
J. Mol. Cell. Cardiol. 1, 1-10
- 82) KUKOVETZ, W.R., PÖCH, G., WURM, A. (1975):
Quantitative relations between cyclic AMP and contraction
as affected by stimulators of adenylate cyclase and inhibitors
of phosphodiesterase.
Advances in Cyclic Nucleotide Research (ed: Drummond, G.,
Greengard, P., Robinson, G.A.) Raven Press N.Y. 5, 396-414
- 83) KUO, J.F., DE RENZO, E.C. (1969):
A comparison of the effects of lipolytic and antilipolytic
agents on adenosine 3',5'-monophosphate levels in adipose
cells as determined by prior labelling with adenin-8- ^{14}C .
J. Biol. Chem. 244, 2252-2260

- 84) LEHMKUHL, D., SPERELAKIS, N. (1963):
Transmembrane potentials of trypsin dispersed chick heart
cells cultured in vitro.
Am. J. Physiol. 205, 1213-1220
- 85) LEHMKUHL, D., SPERELAKIS, N. (1967):
Electrical activity of cultured heart cells.
In: Factors Influencing Myocardial Contractility (ed: Tanz,
R.D., Kavalier, F., Roberts, J.), Academic Press N.Y. and
London, 245-278
- 86) LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J.
(1951):
Protein measurement with Folin phenol reagent.
J. Biol. Chem. 193, 265-275
- 87) McDONALD, T.F., SACHS, H.G. (1975):
Electrical activity in embryonic heart cell aggregates
(developmental aspects).
Pflügers Arch. 354, 151-164
- 88) MAKMAN, M.H., DVORKIN, B., KEEHN, E. (1974):
Hormonal regulation of cyclic AMP in aging and virus-trans-
formed human fibroblasts and comparison with other cultured
cells.
In: Control of Proliferation in Animal Cells (ed: Clarkson,
B. and Baserga, R.), Cold Spring Harbour Laboratory Press
N.Y., 649-663
- 89) MANGANIELLO, V.C., MURAD, F., VAUGHAN, M. (1971):
Effects of lipolytic and antilipolytic agents on cyclic
3', 5' adenosine monophosphate in fat cells.
J. Biol. Chem. 246, 2195-2202
- 90) MARANO, M., KAUMANN, A.J. (1976):
On the statistics of drug-receptor constants for partial
agonists.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 198, 518-525
- 91) MARK, G.E., STRASSER, F.F. (1966):
Pacemaker activity and mitosis in cultures of newborn rat
heart ventricle cells.
Exp. Cell Res. 44, 217-232
- 92) MARK, G.E., HACKNEY, J.D., STRASSER, F.F. (1967):
Morphology and contractile behaviour of cultured heart cells
and their response to various oxygen concentrations.
In: Factors Influencing Myocardial Contractility (ed: Tanz,
R.D., Kavalier, F., Roberts, J.), Academic Press N.Y.-London,
301-315

- 93) MEINERTZ, T., NAWRATH, H., SCHOLZ, H. (1976):
Possible role of cyclic AMP in the relaxation process of
mammalian heart: Effects of dibutyryl-cyclic AMP and theo-
phylline on potassium contractures in cat papillary muscles.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 293, 129-138
- 94) MOSCONA, A. (1952):
Cell suspensions from organ rudiments of chick embryos.
Exp. Cell Res. 3, 535-539
- 95) MOURA, A.-M., SIMPKINS, H. (1975):
Cyclic AMP in cultured myocardial cells under the influence
of chronotropic and inotropic agents.
J. Mol. Cell. Cardiol. 7, 71-77
- 96) OKARMA, T.B., KALMAN, S.M. (1971):
Photoelectric monitoring of single beating heart cells in
culture.
Exp. Cell Res. 69, 128-134
- 97) ØYE, I., SUTHERLAND, E.W. (1966):
The effect of epinephrine and other agents on adenyl cyclase
in the cell membrane of avian erythrocytes.
Biochim. Biophys. Acta 127, 347-354
- 98) PENDLETON, R.G., PETTA, J.M., HAHN, R.A. (1970):
Studies on the myocardial depressant effect of KL-255.
A beta adrenergic receptor antagonist.
Arch. Int. Pharmacodyn. 187, 75-87
- 99) REUTER, H. (1974):
Localization of beta adrenergic receptors and effect of
noradrenaline and cyclic nucleotides on action potentials,
ionic currents and tension in mammalian cardiac muscle.
J. Physiol. 242, 429-451
- 100) RINALDINI, L.M. (1954):
A quantitative method for growing animal cells in vitro.
Nature 173, 1134-1135
- 101) ROBINSON, G.A., BUTCHER, R.W., SUTHERLAND, E.W. (1971):
Cyclic AMP.
New York: Academic Press
- 102) ROBINSON, G.A., BUTCHER, R.W., ØYE, I., MORGAN, H.E.,
SUTHERLAND, E.W. (1965):
The effect of epinephrine on adenosine 3'-5'-phosphate
levels in isolated perfused rat heart.
J. Mol. Pharmacol. 1, 168-177
- 103) RUMERY, R.E., BLANDAUI, R.J. (1964):
The cytodifferentiation of myocardial cells from 4-day
embryonic chick hearts grown in culture.
Acta Anat. 58, 116-130

- 104) RUMERY, R.E., BLANDAU, R.J. HAGEY, P.W. (1961):
Observations on living myocardial cells from cultured
48-hour chick hearts.
Anat. Rec. 141, 253-261
- 105) SCHULZ, J., HAMPRECHT, B. (1973):
Adenosine 3',5' monophosphate in cultured neoblastoma cells:
Effect of adenosine phosphodiesterase inhibitors and benz-
azepines.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 278, 215-225
- 106) SCHWABE, U., EBERT, R. (1972):
Different effects of lipolytic hormones and phosphodiester-
ase inhibitors on cyclic 3',5'-AMP levels in isolated fat
cells.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 274, 287-298
- 107) SCHWAMBORN, V., WITTMANN, R., KAUMANN, A.J. (1976):
Negative chronotropic effects of enantiomers of verapamil
on spontaneously beating cells and atria of new-born rats.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. Suppl. 293, 85 R22
- 108) SHANFELD, J., FRAZER, A., HESS, M.E. (1969):
Dissociation of the increased formation of cardiac adeno-
sine 3',5' monophosphate from positive inotropic effect of
norepinephrine.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 169, 315-320
- 109) SHIGENOBU, K., SPERELAKIS, N. (1971):
Development of sensitivity of tetrodotoxine of chick embryo-
nic hearts with age.
J. Mol. Cell. Cardiol. 3, 271-286
- 110) SKELTON, C.L., LEVEY, G.S., EPSTEIN, S.E. (1970):
Positive inotropic effects of dibutyryl cyclic adenosine
3',5' monophosphate.
Circ. Res. 26, 35-43
- 111) SOBEL, B.E., MAYER, S.E. (1973):
Cyclic adenosine monophosphate and cardiac contractility.
Circ. Res. 32, 407-414
- 112) SPERELAKIS, N. (1972):
Electrical properties of embryonic heart cells.
In: Electrical Phenomena in the Heart (ed: Mello, C.D.)
Academic Press N.Y.-London, 1-61
- 113) SPERELAKIS, N., LEHMKUHL, D. (1964):
Effect of current in cultured chick heart cells.
J. Gen. Physiol. 47, 895-927

- 114) SPERELAKIS, N., SHIGENOBU, K. (1972):
Changes in membrane properties of chick embryonic hearts
during development.
J. Gen. Physiol. 60, 430-453
- 115) STEPHENSON, R.P. (1956):
A modification of receptor theory.
Brit. J. Pharmacol. 11, 379-393
- 116) STOKER, M. (1967):
Contact and short-range interactions affecting growth of
animal cells in culture.
Current Topics in Develop. Biol. 2, 107-128
- 117) SUTHERLAND, E.W., RALL, T.W. (1960):
Relation of adenosine 3',5' phosphate and phosphorylase to
the actions of catecholamines and other hormones.
Pharmacol. Rev. 12, 265-299
- 118) SUTHERLAND, E.W., RALL, T.W., MENON, T. (1962):
Adenyl cyclase.
I. Distribution, preparation and properties.
J. Biol. Chem. 237, 1220-1227
- 119) SUTHERLAND, E.W., ROBINSON, G.A., BUTCHER, R.W. (1968):
Some aspects of the biological role of adenosine 3',5' mono-
phosphate (cyclic AMP).
Circulation 37, 279-306
- 120) TADA, M., KIRCHBERGER, M.A., IORIO, J.-A., KATZ, A.M.
(1974a):
Effects of a cardiac adenosine 3',5' monophosphate-depress-
ant protein kinase on the cardiac sarcoplasmatic reticulum
III. Role of a 22,000 dalton protein component.
Circulation, 48, Suppl. IV, 25
- 121) TADA, M., KIRCHBERGER, M.A., REPKE, D.I., KATZ, A.M. (1974b):
The stimulation of calcium transport in cardiac sarcoplas-
matic reticulum by adenosine 3',5' monophosphate-dependent
protein kinase.
J. Biol. Chem. 249, 6174-6180
- 122) THOMPSON, E.J., WILSON, S.H., SCHUETTE, W.H., WHITEHOUSE, W.C.
(1973):
Measurement of the rate and velocity of movement by single
heart cells in culture.
Am. J. Cardiol. 32, 162-166
- 123) TRENDLENBURG, U., HÖHN, D., GRAEFE, K.H., PLUCHINO, S.
(1971):
The influence of block of catechol-O-methyl-transferase on
the sensitivity of isolated organs to catecholamines.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 271, 59-92

- 124) TSIEN, R.W. (1973):
Adrenaline-like effects of intracellular iontophoresis of cyclic AMP in cardiac Purkinje fibers.
Nature New Biol. 245, 120-122
- 125) TSIEN, R.W. (1974a):
Effects of epinephrine on the pacemaker potassium current of cardiac Purkinje fibers.
J. Gen. Physiol. 64, 293-319
- 126) TSIEN, R.W. (1974b):
Mode of action of chronotropic agents in cardiac Purkinje fibers.
J. Gen. Physiol. 64, 320-342
- 127) TSIEN, R.W., GILES, W., GREENGARD, P. (1972):
Cyclic AMP mediates the effects of adrenaline on cardiac Purkinje fibers.
Nature New Biol. 240, 181-183
- 128) VOGIN, E.E., DHALLA, N.S. (1965):
Inotropic and chronotropic effects of dichloroisoproterenol on rat atria.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 147, 65-69
- 129) WAUD, D.R. (1968):
Pharmacological receptors.
Pharmacol. Rev. 20, 49-88
- 130) WAYMOUTH, Ch. (1959):
Rapid proliferation of sublines of NCTC clone 929 (Strain L) mouse cells in a simple chemically defined medium (MB 752/1).
J. Nat. Cancer Inst. 22, 1003-1017
- 131) WESTFALL, D.P., FLEMING, W.W. (1968):
Sensitivity changes in dog heart to norepinephrine, calcium and aminophylline resulting from pretreatment with reserpine.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 159, 98-106
- 132) WÖPPEL, W., TRENDLENBURG, U. (1973):
Temperature-dependent supersensitivity of isolated atria to catecholamines.
Europ. J. Pharmacol. 23, 302-305
- 133) WOLLENBERGER, A. (1964):
Rhythmic and arrhythmic contractile activity of single myocardial cells cultured in vitro.
Circ. Res. Suppl. II 14+15
- 134) YAMASAKI, Y., TODA, N., FUJIWARA, M. (1973):
Effects of intracellularly-applied cyclic 3',5'-AMP and dibutyryl cyclic 3',5'-AMP on the electrical activity of isolated sino-atrial node.
Jap. J. Pharmacol. 23, Suppl. 40

- 135) ZEIDMANN, I. (1947):
Chemical factors in mutual adhesiveness of epithelial cells.
Cancer Res. 7. 386-389

7. T A B E L L E N
=====

Tabelle XVI: Apparente Dissoziationskonstanten K_B zwischen (-)-Bupranolol und dem

β -Adrenozeptoren, ermittelt anhand der Hemmung des positiv chronotropen Effekts von β -Adrenoceptorliganden an kultivierten Herzzellen.

Tier- art	Abb. Nr.	Zelle		Versuchsbedingung	Inkuba- tionszeit in (-)-Bupr.	Frequenz (Schläge/min) $\bar{x} \pm SD$ (Reg. Zeit)	Konzentra- tions- quotient (KQ)	$K_B [(-)-Bupr.]$ KQ - 1 Molar $\times 10^{-10}$
		Nr.	Alter (Tage)					
Ratte	13	1	5	No drug $4 \times 10^{-11} M$ (-) ISO + $1 \times 10^{-9} M$ (-) BU $2 \times 10^{-10} M$ (-) ISO + $1 \times 10^{-9} M$ (-) BU $4 \times 10^{-10} M$ (-) ISO + $2 \times 10^{-7} M$ (-) BU $3 \times 10^{-8} M$ (-) ISO + $2 \times 10^{-7} M$ (-) BU $1 \times 10^{-7} M$ (-) ISO + $2 \times 10^{-6} M$ (-) BU $3 \times 10^{-7} M$ (-) ISO + $2 \times 10^{-6} M$ (-) BU	33	43 $\pm$ 9 (5) 68 $\pm$ 6 (5) 118 $\pm$ 6 (5) 44 $\pm$ 6 (5) 119 $\pm$ 9 (5) 74 $\pm$ 10 (5) 113 $\pm$ 5 (5)	5.5	2.2
				No drug $2 \times 10^{-8} M$ (-) BU $6 \times 10^{-10} M$ (-) ISO + $2 \times 10^{-6} M$ (-) BU				
	14	3	4	No drug $6 \times 10^{-10} M$ (-) ISO + $2 \times 10^{-9} M$ (-) BU $6 \times 10^{-9} M$ (-) ISO + $2 \times 10^{-9} M$ (-) BU $4 \times 10^{-9} M$ (-) ISO + $2 \times 10^{-7} M$ (-) BU $6 \times 10^{-7} M$ (-) ISO + $2 \times 10^{-7} M$ (-) BU $6 \times 10^{-7} M$ (-) ISO + $1 \times 10^{-6} M$ (-) BU $3 \times 10^{-6} M$ (-) ISO + $1 \times 10^{-6} M$ (-) BU	53	61 $\pm$ 6 (9) 61 $\pm$ 8 (26) 106 $\pm$ 18 (11) 59 $\pm$ 6 (15) 115 $\pm$ 17 (12) 44 $\pm$ 8 (8) 115 $\pm$ 16 (10)	9	2.5
				No drug $2 \times 10^{-10} M$ (-) ISO $2 \times 10^{-10} M$ (-) ISO + $2 \times 10^{-9} M$ (-) BU $2 \times 10^{-9} M$ (-) ISO + $2 \times 10^{-9} M$ (-) BU				
	4	3			30	69 (21) 91 (5) 72 (9) 91 (5)	10	2.2

h) In diesem Experiment wurde vor Versuchsbeginn das Medium 4 mal gewechselt. Der Mediumwechsel beeinflusste die Frequenz der Spontanaktivität der Zellen nicht. Nach der ersten Dosis-Wirkungskurve für den positiv chronotropen Effekt der Katecholamine wurde das Medium wiederum 4 mal erneuert. Die Zugabe von (-)-Bupranolol beeinflusste die Grundfrequenz nicht.

Fortsetzung Tabelle XVI:

Tierart	Abb. Nr.	Zelle		Versuchsbedingung	Inkubationszeit in (-)-Bupr.	Frequenz (Schläge/min) $\bar{x} \pm SD$ (Reg. Zeit)	Konzentrationsquotient (KQ)	$K_B \frac{[(-)-Bupr.]}{KQ - 1}$ Molar $\times 10^{-10}$
		Nr.	Alter (Tage)					
Ratte	5	5	6	No drug		90 + 5 (18) ^a		
				2x10 ⁻⁹ M (-)DCI		95 + 3 (7)		
	6	6	6	6x10 ⁻⁹ M (-)DCI		115 + 10 (7)		
				6x10 ⁻⁹ M (-)DCI + 1x10 ⁻⁹ M (-)BU		92 + 9 (5)		
	7	7	4	2x10 ⁻⁸ M (-)DCI + 1x10 ⁻⁹ M (-)BU	21	109 $\pm$ 9 (8)	4.7	2.7
				No drug		72 + 2 (3)		
	8	8	6	2x10 ⁻⁸ M (-)DCI		91 $\pm$ 3 (10)		
				2x10 ⁻⁷ M (-)DCI + 1x10 ⁻⁸ M (-)BU		77 + 4 (4)		
Ratte	16	7	4	6x10 ⁻⁷ M (-)DCI + 1x10 ⁻⁸ M (-)BU	25	94 + 4 (11)	26.3	4.0
				No drug		71 + 7 (7)		
	16	7	4	2x10 ⁻⁹ M (-)DCI		89 $\pm$ 1 (5)		
				2x10 ⁻⁸ M (-)DCI + 2x10 ⁻⁹ M (-)BU		88 + 3 (5)		
	16	7	4	6x10 ⁻⁸ M (-)DCI + 2x10 ⁻⁹ M (-)BU	38	95 + 4 (4)	10.5	2.1
				2x10 ⁻⁷ M (-)DCI + 4x10 ⁻⁸ M (-)BU		85 + 3 (15)		
	16	7	4	6x10 ⁻⁷ M (-)DCI + 4x10 ⁻⁸ M (-)BU	23	95 + 3 (8)	159	2.5
				No drug		110 + 4 (5)		
Ratte	8	8	6	1x10 ⁻⁹ M (-)DCI		118 + 5 (5)		
				2.4x10 ⁻⁹ M (-)DCI		124 + 3 (5)		
	8	8	6	3x10 ⁻⁸ M (-)DCI + 1.2x10 ⁻⁸ M (-)BU	34	115 + 3 (5)	36.3	3.4
				6x10 ⁻⁸ M (-)DCI + 1.2x10 ⁻⁸ M (-)BU		122 $\pm$ 6 (5)		

Fortsetzung Tabelle XVI:

Tier- art	Abb. Nr.	Zelle		Versuchsbedingung	Inkuba- tionszeit in (-)-Bupr.	Frequenz (Schläge/min) $\bar{x} \pm SD$ (Reg. Zeit)	Konzentra- tions- quotient (KQ)	$K_B \frac{[(-)-Bupr.]}{KQ - 1}$ Molar $\times 10^{-10}$
		Nr.	Alter (Tage)					
Ratte		9	3	No drug 6×10^{-6} M U-0521 6×10^{-6} M U-0521 + 2×10^{-9} M (-)BU 6×10^{-5} M U-0521 + 2×10^{-9} M (-)BU	20	103 $\pm$ 5 (10) 134 $\pm$ 5 (3) 106 $\pm$ 6 (10) 128 $\pm$ 7 (4)	14.2	1.5
	18	10	3	No drug 6×10^{-6} M U-0521 6×10^{-6} M U-0521 + 2×10^{-9} M (-)BU 2×10^{-5} M U-0521 + 2×10^{-9} M (-)BU	17	106 $\pm$ 5 (7) 139 $\pm$ 4 (4) 103 $\pm$ 7 (6) 119 $\pm$ 7 (5)	9.2	2.5
	18	11	4	No drug 9×10^{-8} M NA 9×10^{-8} M NA + 1×10^{-7} M (-)BU + 1×10^{-7} M (-)BU	15	49 $\pm$ 8 (9) 45 $\pm$ 10 (12) 110 $\pm$ 13 (7)	240	4.2
Katze		12 ⁱ	10	No drug 9×10^{-10} M ISO 2.7×10^{-7} M ISO + 1×10^{-7} M (-)BU + 1×10^{-7} M (-)BU	18	44 $\pm$ 10 (13) 0 $\pm$ 0 116 $\pm$ 12 (5)	435	2.3

i) Die beobachtete Zelle wurde am 7. Tag in ein neues Kulturgefäß transplantiert.

Tabelle XVII: Effekt von β -Adrenoceptorliganden auf den zellulären cAMP Gehalt
Konzentrationsquotienten zwischen gleichcheffektiven Konzentrationen
eines Agonisten ((-)-Isoproterenol bzw. (-)-DCI) in Gegenwart und
Abwesenheit des β -Adrenoceptorblockers (-)-Bupranolol.

Tierart	(-)-Bupranolol	Agonist bzw. partieller Agonist	Konzentrationsquotient (KQ)	Auftragung a)	log (KQ-1)	Abb.Nr.
Ratte	2×10^{-9} M	(-)-DCI	11	%	1.0	38 ●
			40	P	1.6	■
			13	Z	1.1	▲
	1.4×10^{-8} M	(-)-DCI	105	%	2.0	38 ●
			64	P	1.8	■
			32	Z	1.5	▲
Hühnchen	6×10^{-8} M	(-)-DCI	1380	%	3.1	38 ●
			1050	P	3.0	■
			400	Z	2.6	▲
	2×10^{-9} M	(-)-Isoproterenol	5	%	0.6	32
			50	%	1.7	32
	1×10^{-8} M	(-)-Isoproterenol	60	%	1.8	42

a) Auftragung der Wirkungen in prozentualer Zunahme des cAMP-Gehalts (%), in Zunahme bezogen auf mg Zellprotein (P), in Zunahme bezogen auf die Zellzahl (Z).

Tabelle XVIII: Vergleich der apparenten Affinitätskonstanten verschiedener β -Adrenoceptorliganden. Die Ergebnisse, die an Zellkulturen gewonnen wurden (Hemmung des positiv chronotropen Effekts) werden mit Daten verglichen, die an rechten Vorhöfen ermittelt wurden.

Antagonist	Agonist	Tierart	log der Affinitäts- konstanten zw. β - Adrenoceptor u. Anta- gonist ermittelt an : Zellkultur re.Vorhof	Autoren
(+) -Bupranolol	(-) -Isoproterenol	Katze	9.2	KAUMANN + Mitarb. (1977b)
		Meerschweinchen	9.1	KAUMANN + Mitarb. (1977b)
		Ratte	9.0	PENDELTON + Mitarb. (1970)
(-) -Bupranolol		Katze	9.6	KAUMANN + Mitarb. (1977b)
		Meerschweinchen	9.4	KAUMANN + Mitarb. (1977b)
		Ratte	9.2	KAUMANN + Mitarb. (1977a)
(-) -Bupranolol	(-) -DCI	Ratte	9.5	
	U-0521	Ratte	9.7 c)	KAUMANN + Mitarb. (1977a)
		Ratte	9.4	
(+) -DCI d)	(-) -Isoproterenol	Katze		KAUMANN + Mitarb. (1977b)
		Meerschweinchen	7.5	
(-) -DCI		Ratte	7.7	KAUMANN + Mitarb. (1977b)

c) Berechnet aus Konzentrationsquotienten unter Annahme einer kompetitiven Hemmung.

d) Nach der Theorie sollten sich die für das Razemat ermittelten Konstanten um einen Faktor 2 von den Konstanten, die für das (-)-Derivat ermittelt wurden, unterscheiden.

8. A B B I L D U N G E N
=====

Die Ziffern neben den Symbolen geben die Anzahl der Versuche, die senkrechten Linien den mittleren Fehler des Mittelwertes (SEM) an.

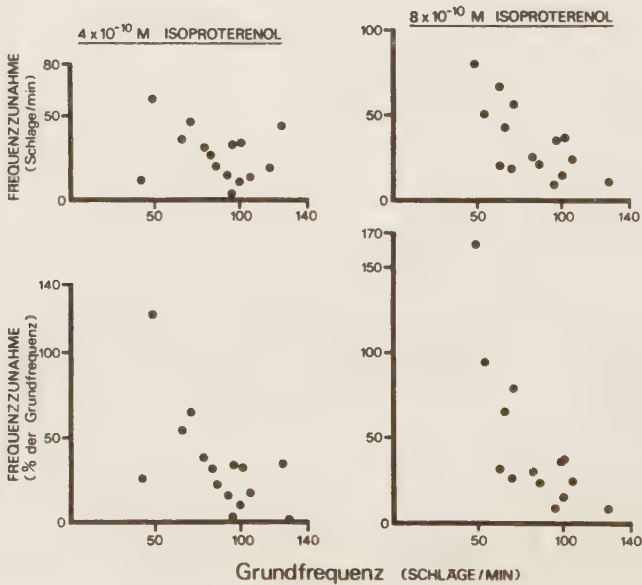


Abb. 9: Abhängigkeit der Frequenzzunahme, die durch 4×10^{-10} M und 8×10^{-10} M (-)-Isoproterenol induziert wird, von der Grundfrequenz der kultivierten spontanschlagenden Rattenherzzellen.

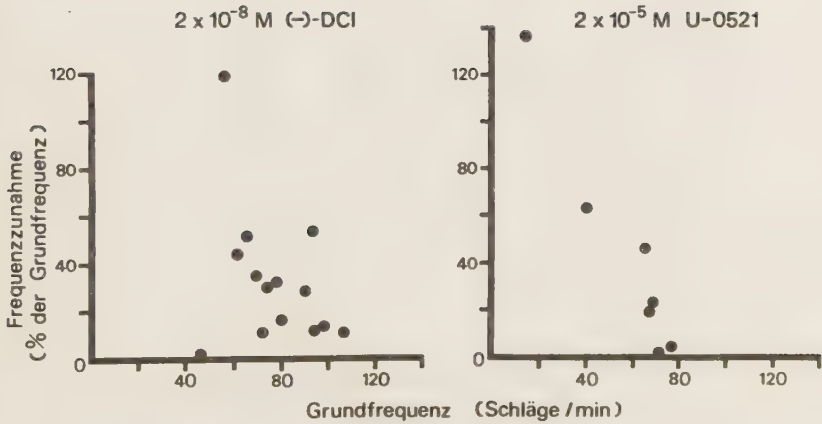


Abb. 10: Abhängigkeit der Frequenzzunahme, die durch $2 \times 10^{-8} \text{ M } (-)\text{-DCI}$ bzw. $2 \times 10^{-5} \text{ M } \text{U-0521}$ induziert wird, von der Grundfrequenz der kultivierten spontanschlagenden Rattenherzzellen.

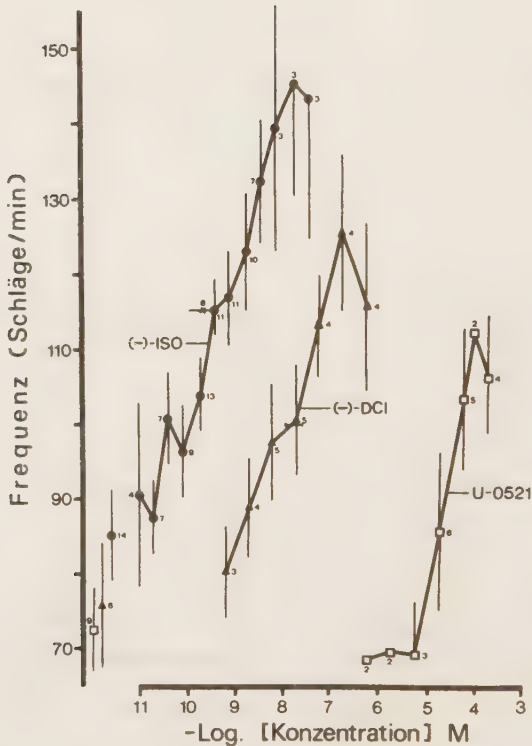


Abb. 11: Dosis-Wirkungskurven des von (-)-Isoproterenol (ISO), (-)-DCI und U-0521 induzierten positiv chronotropen Effekts, die an spontanschlagenden kultivierten einzelnen Substanzen wurden anhand von vollständigen Dosis-Wirkungskurven, die an Einzelzellen bestimmt wurden, ermittelt. Die EC_{50} beträgt für (-)-ISO $2.3 \pm 1.6 \times 10^{-10}$ M ($n=6$) und für (-)-DCI $1.5 \pm 1.5 \times 10^{-8}$ M ($n=5$) (horizontale Striche). Die Grundfrequenzen der Zellen, an denen Dosis-Wirkungskurven der durch die drei Liganden induzierten positiv chronotropen Effekte untersucht wurden, lagen jeweils in folgenden Bereichen: Versuchsgruppe (-)-ISO zwischen 63-127 Schläge pro Minute, (-)-DCI 61-97 Schläge pro Minute und U-0521 55-85 Schläge pro Minute.

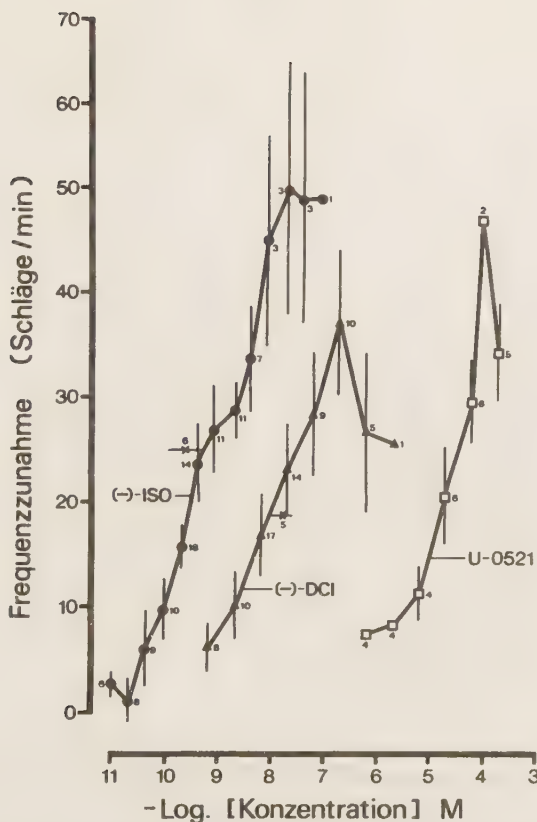


Abb. 12: Vergleich des positiv chronotropen Effekts von (-)-Isoproterenol, (-)-DCI und U-0521 an spontanschlagenden Rattenherzzellen. Aufgetragen ist die Frequenzzunahme bezogen auf die Grundfrequenz gegen die Konzentration des entsprechenden Agonisten. Die Grundfrequenzen der spontanschlagenden Zellen der einzelnen Versuchsgruppen rangierten in folgenden Bereichen: Für die Dosis-Wirkungskurve des positiv chronotropen Effekts von (-)-Isoproterenol zwischen 23 und 125, (-)-DCI zwischen 44 und 110 und U-0521 zwischen 55 und 85 Schlägen pro Minute.

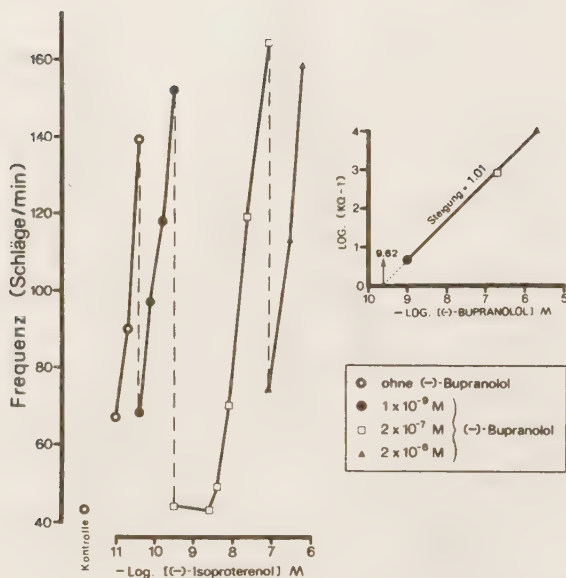


Abb. 13: Kompetitive Hemmung des positiv chronotropen Effekts von (-)-Isoproterenol durch (-)-Bupranolol. Versuch an einer 5 Tage lang kultivierten Rattenherzzelle mit Schrittmacheraktivität. Jedes Symbol der kumulativen Dosis-Wirkungskurve ist der Mittelwert der Gleichgewichtswirkung der jeweiligen Katecholaminkonzentration. In ein und demselben Medium wurden 4 sukzessive Dosis-Wirkungskurven des positiv chronotropen Effekts von (-)-Isoproterenol auf die Schrittmacheraktivität der kultivierten Zellen bestimmt, wobei die erste in Abwesenheit, die folgenden in Gegenwart 3 verschiedener Konzentrationen (-)-Bupranolol aufgenommen wurden. Nach Zugabe der jeweiligen Konzentration (-)-Bupranolol wurde mindestens 11 Minuten gewartet, bevor die erste neue Konzentration (-)-Isoproterenol zugefügt wurde. Die insgesamt zugegebenen Substanzmengen veränderten das Volumen um 2.4 %. Konzentrationsquotienten zwischen gleich effektiven Konzentrationen (-)-Isoproterenol in Gegenwart und Abwesenheit des Hemmers wurden bei 118 ●, 119 □, 113 ▲ Schlägen/Minute durch Interpolation zur ersten Dosis-Wirkungskurve ermittelt und in doppel-log. Form aufgetragen (ARUNLAKSHANA und SCHILD, 1959). Weitere Einzelheiten vergleiche Zelle 1 in Tabelle XVI.

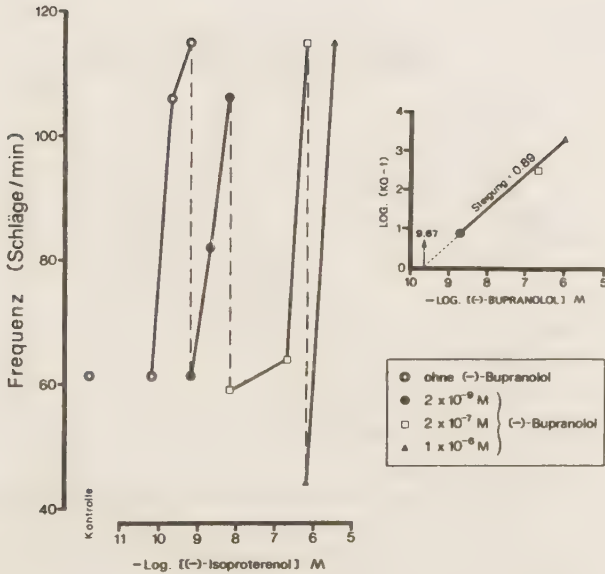


Abb. 14: Kompetitive Hemmung des durch (-)-Isoproterenol an einer 4 Tage alten, spontanschlagenden Rattenherzzelle induzierten positiv chronotropen Effekts durch (-)-Bupranolol. Versuchsdurchführung wie in Abb. 13 beschrieben. Konzentrationsquotienten zwischen gleichwirksamen Konzentrationen (-)-Isoproterenol in Gegenwart und Abwesenheit von (-)-Bupranolol wurden bei 106 (●) (2×10^{-9} M (-)-Bupranolol), 115 (□) (2×10^{-7} M (-)-Bupranolol), 115 (▲) (1×10^{-6} M (-)-Bupranolol) Schlägen pro Minute durch Interpolation zur ersten Dosis-Wirkungskurve (○) ermittelt und in doppel-log. Form aufgetragen. Weitere Einzelheiten siehe Tabelle XVI, Zeile 3.

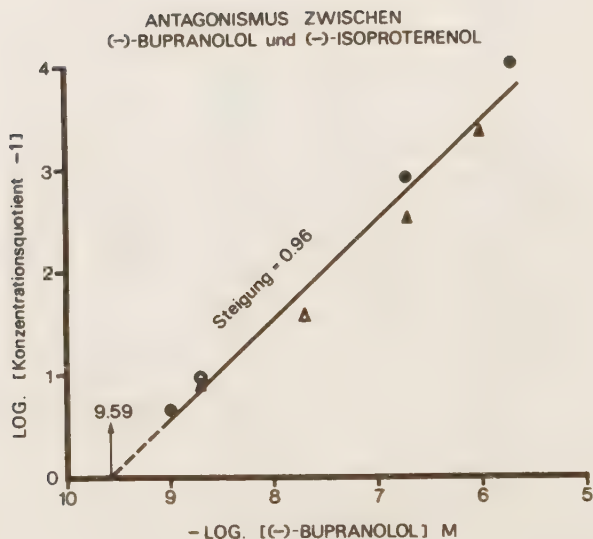


Abb. 15: Antagonismus zwischen (-)-Bupranolol und (-)-Isoproterenol: Alle Konzentrationsquotienten der Tabelle XVI, die zwischen chronotrop gleichwirksamen Konzentrationen (-)-Isoproterenol, die in Gegenwart und Abwesenheit des Hemmers ermittelt wurden, sind gegen die entsprechende Konzentration (-)-Bupranolol in einem doppelt log. Koordinatensystem aufgetragen.
Symbole: Zelle Nr. 1 (●), 2 (Δ), 3 (▲), 4 (○).

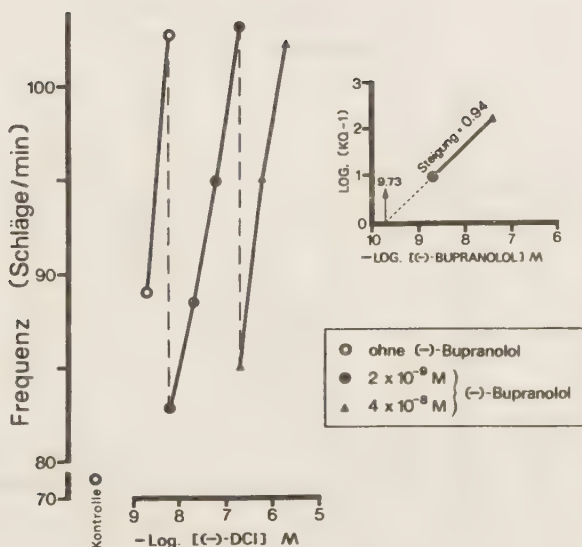


Abb. 16: Kompetitive Hemmung des positiv chronotropen Effekts von (-)-DCI durch (-)-Bupranolol. Versuch an spontan-schlagenden kultivierten Rattenherzzellen. Versuchsdurchführung wie in Abb. 13 beschrieben. Alter der Zelle 4 Tage. Konzentrationsquotienten zwischen gleichwirksamen Konzentrationen (-)-DCI in Gegenwart und Abwesenheit des β -Adrenoceptorblockers wurden bei 95 (●) (2×10^{-9} M (-)-Bupranolol), 95 (▲) (4×10^{-8} M (-)-Bupranolol) Schlägen pro Minute durch Interpolation zur ersten Dosis-Wirkungskurve ermittelt und in doppel-log. Form aufgetragen. Weitere Einzelheiten siehe Tabelle XVI, Zelle 7.

Antagonismus zwischen (-)-Bupranolol und (-)-DCI

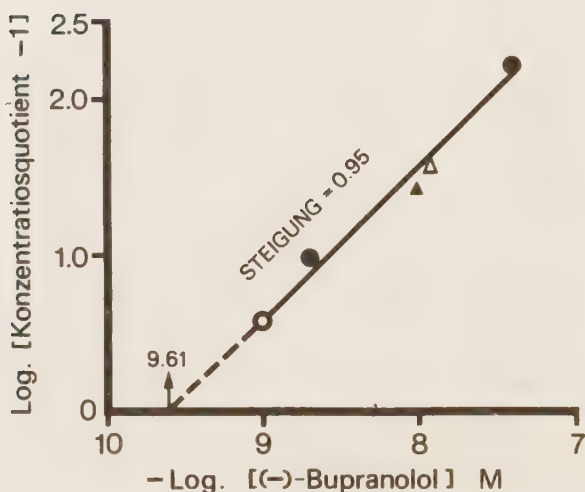


Abb. 17: Antagonismus zwischen (-)-Bupranolol und (-)-DCI ermittelt an spontanschlagenden kultivierten Rattenherzzellen. Alle Konzentrationsquotienten der Tabelle XVI, die zwischen chronotrop gleicheffektiven Konzentrationen (-)-DCI in Gegenwart und Abwesenheit des Hemmers ermittelt wurden, sind gegen die entsprechende Konzentration (-)-Bupranolol in einem doppel-log. Koordinatensystem aufgetragen.
Symbole: Zelle Nr. 5(○), 6(△), 7(●), 8(▲).

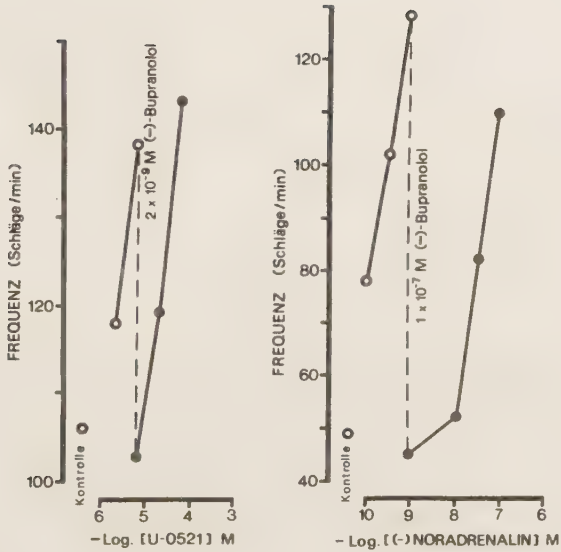


Abb. 18: Hemmung des positiv chronotropen Effekts von U-0521 und (-)-Noradrenalin durch (-)-Bupranolol. Versuch an spontanschlagenden kultivierten Rattenherzzellen. Versuchsdurchführung siehe Abb. 13. Konzentrationsquotienten zwischen gleichwirksamen Konzentrationen in Gegenwart und Abwesenheit von (-)-Bupranolol wurden ermittelt. Weitere Einzelheiten siehe Tabelle XVI, Zeile Nr. 10 und 11.

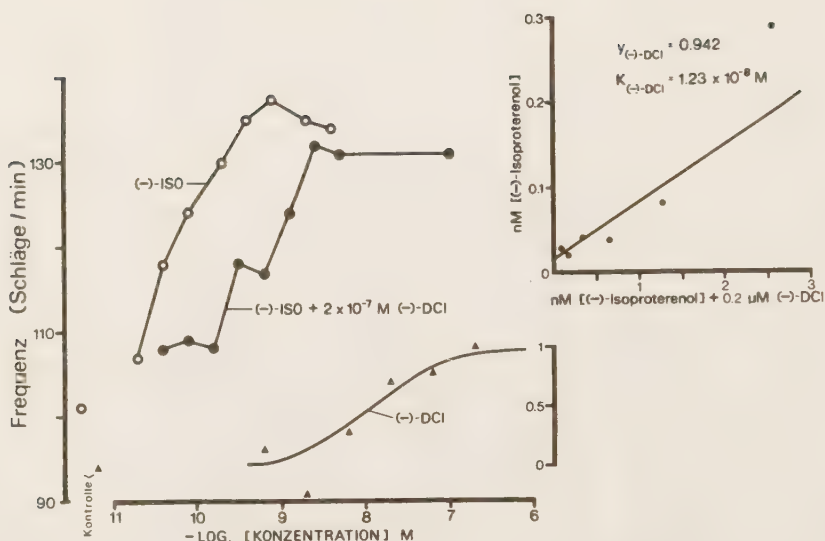


Abb. 19: Bestimmung der fraktionellen Rezeptorbesetzungskurve und der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten zwischen (-)-DCI und den β -Adrenoceptoren anhand des Antagonismus zwischen dem partiellen Agonisten und (-)-Isoproterenol. Versuch an einer 4 Tage alten spontanschlagenden Rattenherzzelle. Versuchsablauf siehe Text, Methode nach MARANO und KAUMANN (1976). Die Konzentrationen (-)-Isoproterenol, die in Gegenwart von (-)-DCI und bei Abwesenheit des partiellen Agonisten gleiche Effekte induzieren, werden in einem linearen System gegeneinander aufgetragen. Eine gewichtete lineare Regression wurde nach MARANO und KAUMANN (1976) berechnet (das Computerprogramm wurde mir freundlicherweise von Dr. Kaumann überlassen). Die Steigung der Regressionsgeraden ist umgekehrt proportional der fraktionellen Rezeptorbesetzung der β -Adrenoceptoren durch die verwendete (-)-DCI-Konzentration (y_{DCI}). Hieraus läßt sich die Gleichgewichtsdissoziationskonstante des (-)-DCI β -Adrenoceptorkomplexes (K_{DCI}), sowie die fraktionelle Rezeptorbesetzungskurve berechnen. Die berechnete fraktionelle Rezeptorbesetzungskurve ist in das Diagramm zwischen die experimentellen Werte der durch (-)-DCI induzierten Effekte eingezeichnet, wobei die durch (-)-DCI hervorgerufene chronotrope Maximalwirkung willkürlich als Maß für 100% Rezeptorbesetzung gesetzt ist.

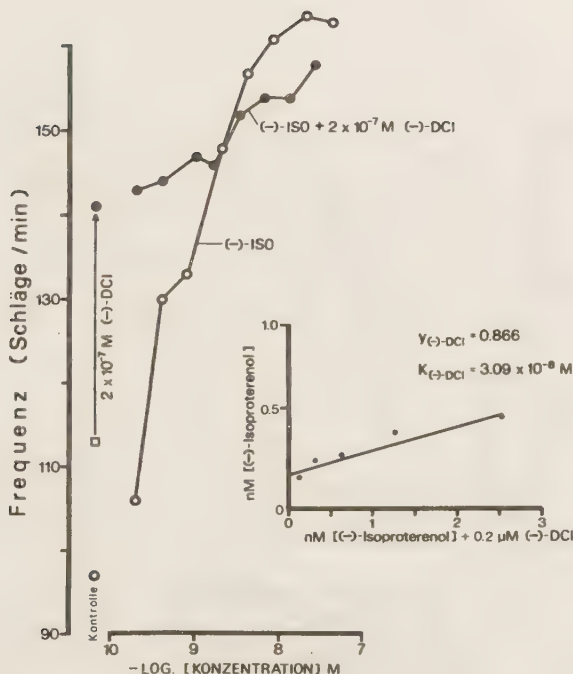


Abb. 20: Bestimmung einer Gleichgewichtsdissoziationskonstanten zwischen (-)-DCI und dem β -Adrenoceptor anhand des Antagonismus zwischen (-)-DCI und (-)-Isoproterenol an einer 5 Tage alten kultivierten Rattenherz-zelle. Methode nach MARANO und KAUMANN (1976). Versuchsablauf siehe Theorie. Die gewichtete lineare Regression ergibt für 2×10^{-7} M (-)-DCI eine fraktio-nelle Rezeptorbesetzung (y_{DCI}) von 0.866. Die hiermit berechnete Gleichgewichtsdissoziationskonstante des (-)-DCI β -Adrenoceptorkomplexes beträgt 3.09×10^{-8} M.

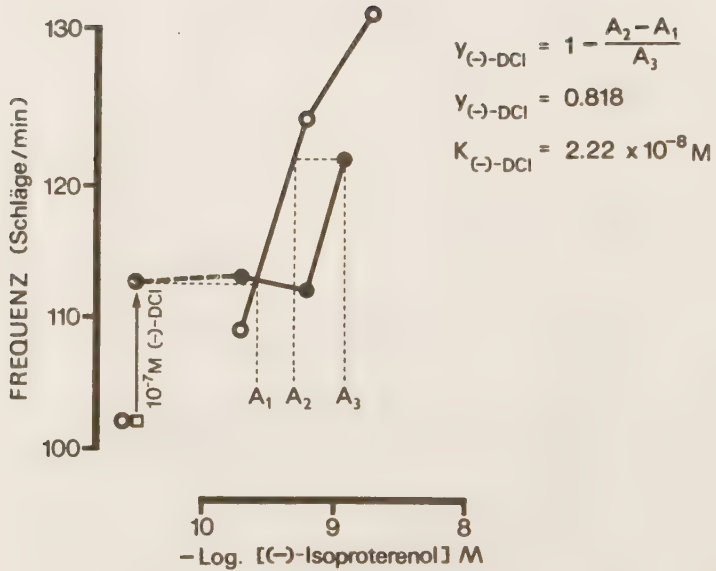


Abb. 21: Bestimmung der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten zwischen (-)-DCI und dem β -Adrenoceptor anhand des Antagonismus zwischen (-)-DCI und (-)-Isoproterenol. Methode: KAUMANN (1973). Versuchsablauf siehe "theoretische Grundlagen".

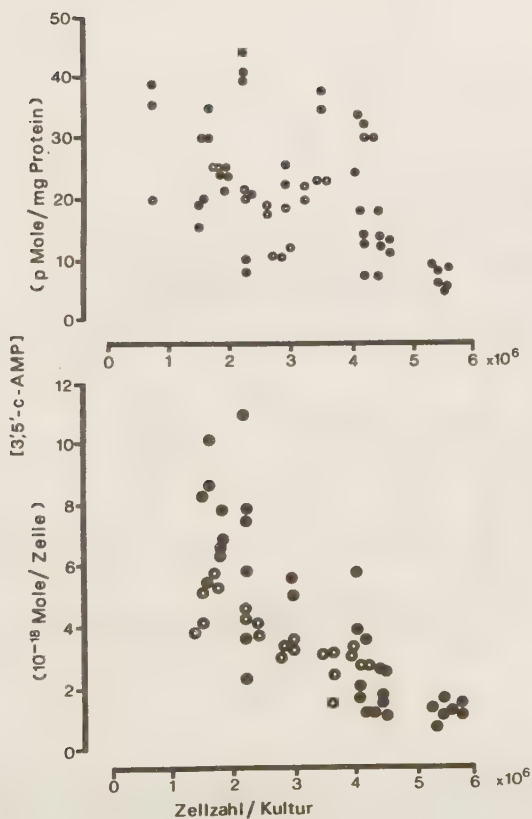


Abb. 22: Abhängigkeit des cAMP-Gehalts kultivierter Rattenherzzellen von der Gesamtzellzahl im Kulturgefäß. Geschlossene Symbole: Der Versuch wurde in serumfreiem Medium durchgeführt. Offene Symbole: Versuchsdurchführung in serumhaltigem Medium.

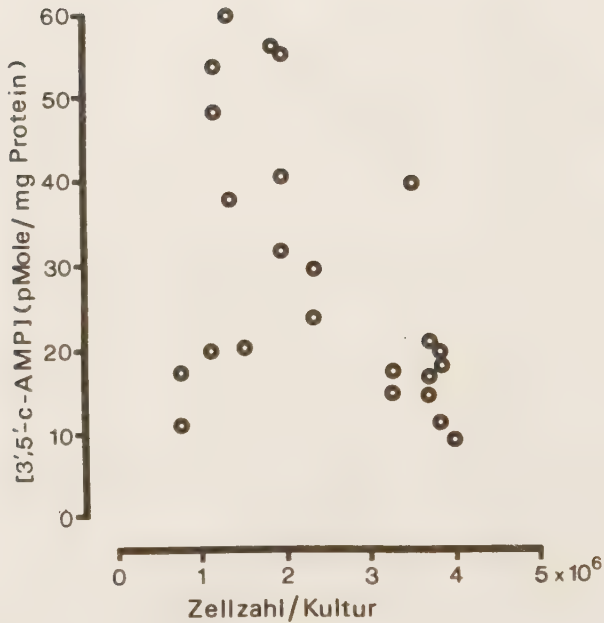


Abb. 23: Abhängigkeit des cAMP-Gehalts kultivierter embryonaler Hühnerherzzellen von der Gesamtzellzahl der Kultur. Alle Versuche an Hühnerherzzellen wurden in serumhaltigem Medium durchgeführt.

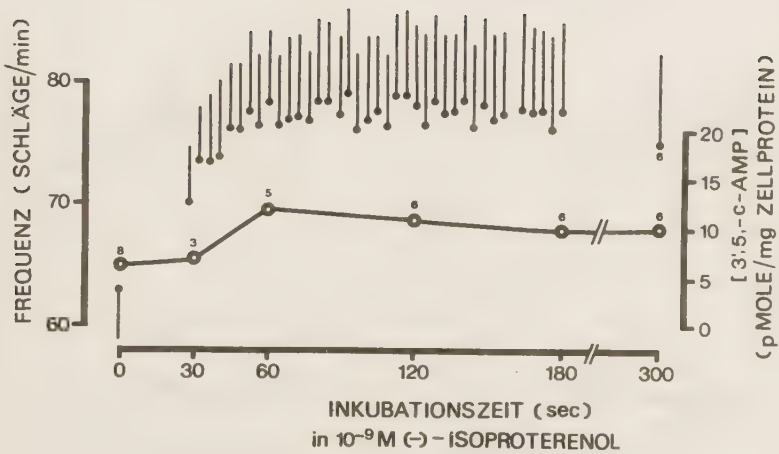


Abb. 24: Vergleich der Kinetik des positiv chronotropen Effekts (●) mit der Änderung des cAMP-Gehalts (○) von kultivierten Rattenherzzellen nach Inkubation in 1×10^{-9} M (-)-Isoproterenol. Der Vergleich wurde unter gleichen Versuchsbedingungen durchgeführt (serumfreies Medium, Zellzahl pro Kultur zwischen 4.8×10^6 und 6.8×10^6 Zellen). Der halbmaximale Effekt auf die Schlagfrequenz ist nach $t_{1/2} = 23.5 \pm 1.8$ sec $n=6$ erreicht.

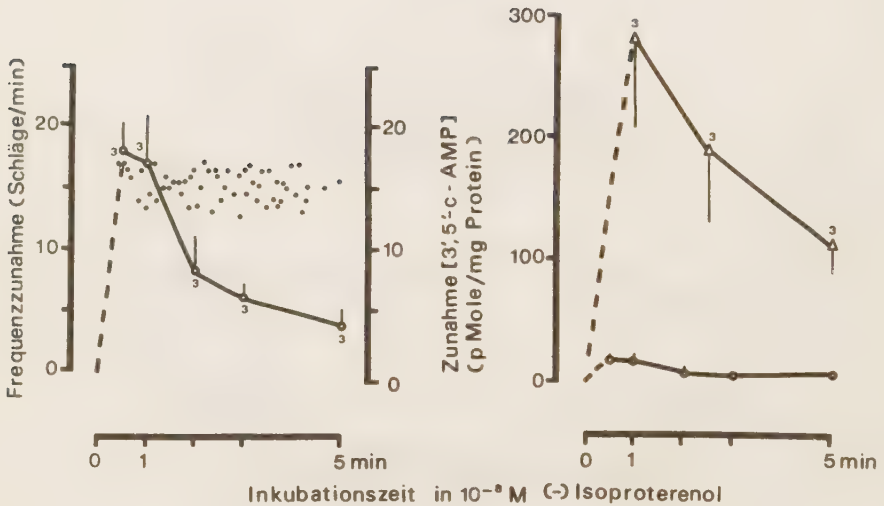


Abb. 25: Vergleich der Zeitabhängigkeit des positiv chronotropen Effekts (●) von 1×10^{-8} M (-)-Isoproterenol mit der Kinetik der Änderung des cAMP-Gehalts in Gegenwart (▲) und Abwesenheit (○) des Phosphodiesterasehemmers 3-Isobutyl-1-Methylxanthin (MIX) (15 Minuten Präinkubation in 1 mM MIX). Versuch an kultivierten Rattenherzzellen. Die Frequenzzunahmen (linker Bildteil ●) sind Mittelwerte aus Versuchen an 4 Zellen. Der Vergleich fand unter ähnlichen Versuchsbedingungen statt (serumfreies Medium, Zellzahl pro Kultur zwischen 4.0×10^6 und 6.9×10^6 Zellen).

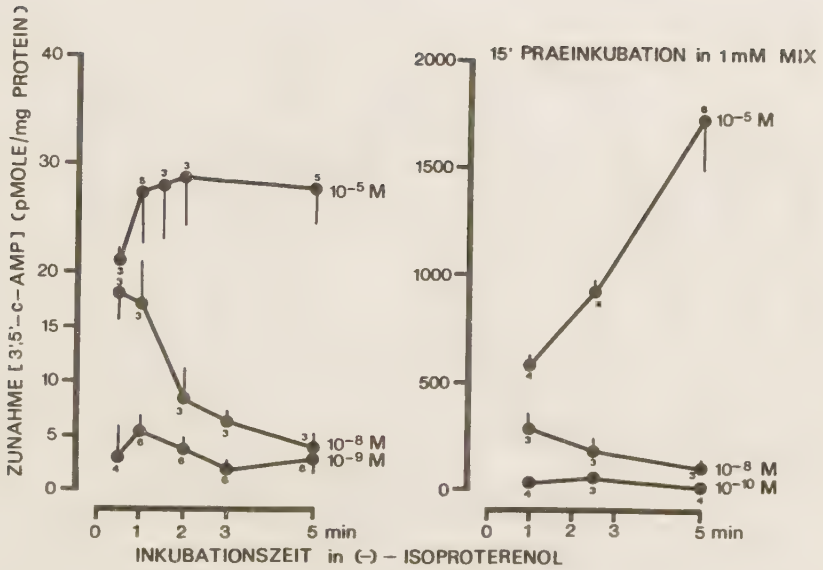


Abb. 26: Vergleich der Effekte verschiedener Konzentrationen (-)-Isoproterenol auf den cAMP-Gehalt von kultivierten Rattenherzzellen in Gegenwart und Abwesenheit des Phosphodiesterasehemmers MIX (15 Minuten Präinkubation in 1 mM MIX).

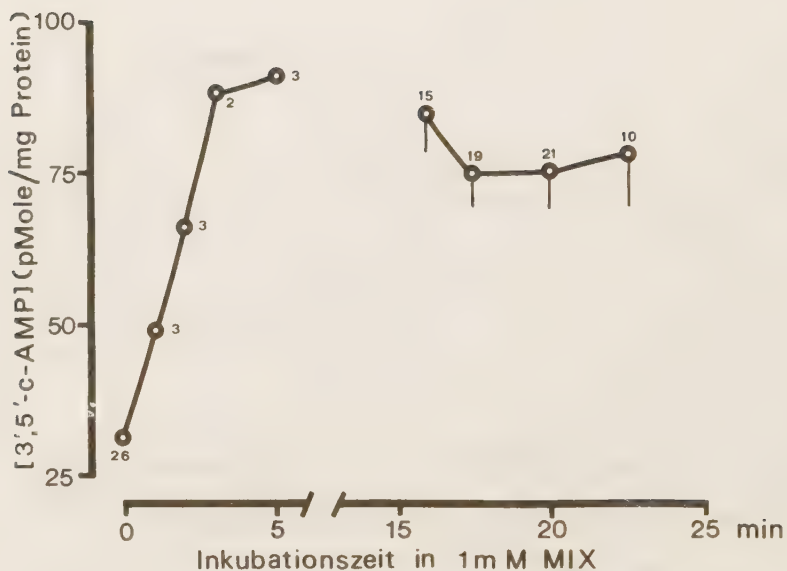


Abb. 27: Zeitabhängigkeit des Effekts von 1 mM 3-Isobutyl-1-Methylxanthin (MIX) auf den cAMP-Gehalt von kultivierten Rattenherzzellen. Das Einsetzen des Effekts ist an einer Versuchsgruppe ermittelt. Die Wirkung zwischen 15 und 25 Minuten Inkubationszeit ist aus Ergebnissen von Versuchen an unterschiedlichen Zellchargen ermittelt.

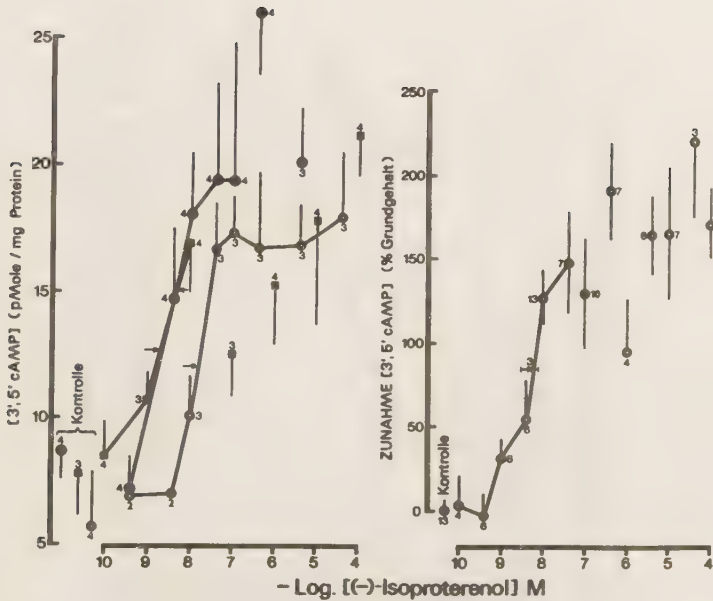


Abb. 28: Dosis-Abhängigkeit der Änderung des zellulären cAMP-Gehalts nach 1 Minute Inkubation der Rattenherzzellen in unterschiedliche Konzentrationen (-)-Isoproterenol. Linker Bildteil: Dosis-Wirkungskurven ermittelt an 3 unabhängigen Versuchen, die jeweils an einer Zellcharge (verschiedene Symbole) durchgeführt wurden. Anhand dieser Kurven wurde die EC_{50} der Wirkung von (-)-Isoproterenol auf die Änderung des zellulären cAMP-Gehalts bestimmt (Pfeile). Die EC_{50} beträgt im Mittel $4,9 + 1,8 \times 10^{-9} \text{ M}$ (-)-Isoproterenol. Rechter Bildteil: Zusammenfassung verschiedener Experimente in normierter Auftragung (Zunahme des cAMP-Gehalts in % ausgehend vom jeweiligen Mittelwert des Grundgehalts). Die aus den Einzelversuchen ermittelte EC_{50} (horizontale Linie = SEM) ist eingetragen.

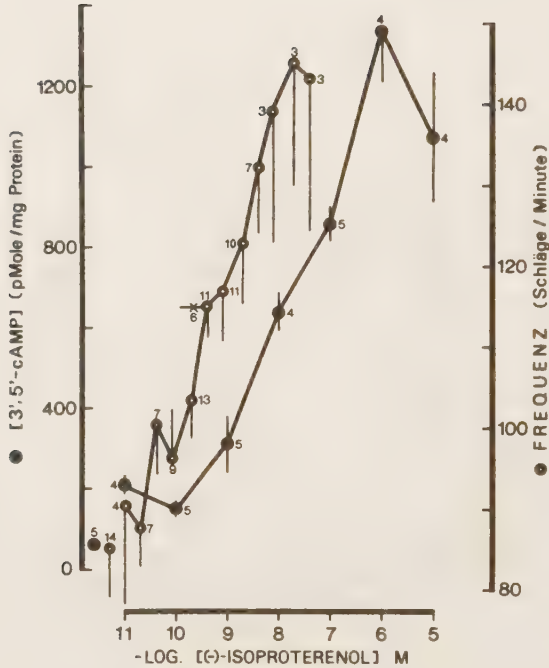


Abb. 29: Dosis-Abhängigkeit der Änderung des zellulären cAMP-Gehalts nach 1 Minute Inkubation der Rattenherzzellen in (-)-Isoproterenol in Gegenwart von 1 mM MIX (●). Zur Bestimmung der Dosis-Abhängigkeit wurden Zellen einer Charge verwendet. Die Änderung des cAMP-Gehalts ist mit der Dosis-Wirkungskurve des positiv chronotropen Effekts Abb. 11 verglichen (○).

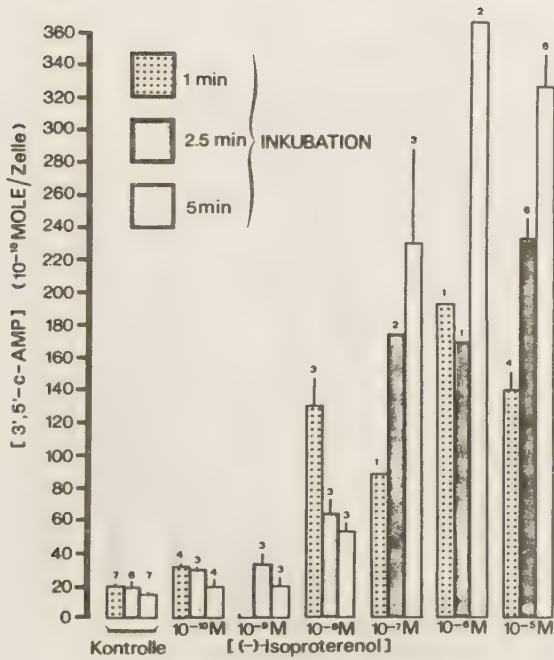


Abb. 30: Dosis-Abhängigkeit des Effekts von (-)-Isoproterenol nach verschiedenen Inkubationszeiten auf den cAMP-Gehalt von kultivierten Rattenherzzellen, die 15 Minuten in 1 mM MIX präinkubiert waren. Es sind Versuche an verschiedenen Zellchargen zusammengefaßt. Aufgetragen ist der cAMP-Gehalt bezogen auf eine Einzelzelle.

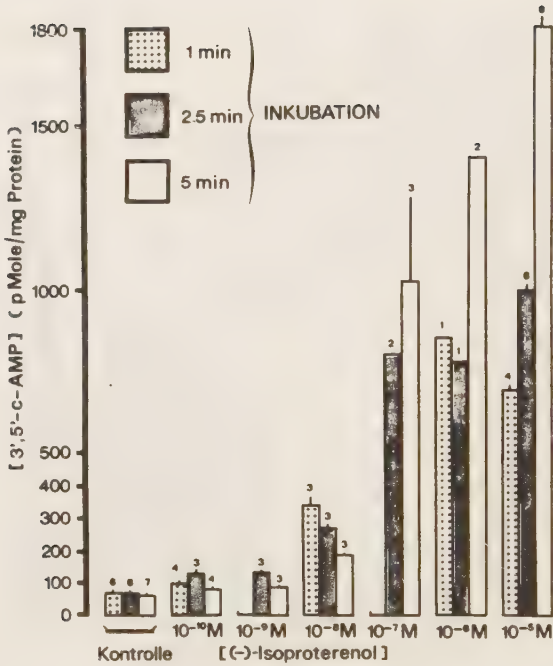


Abb. 31: Wie in Abb. 30, jedoch Auftragung des cAMP-Gehalts bezogen auf Zellprotein.

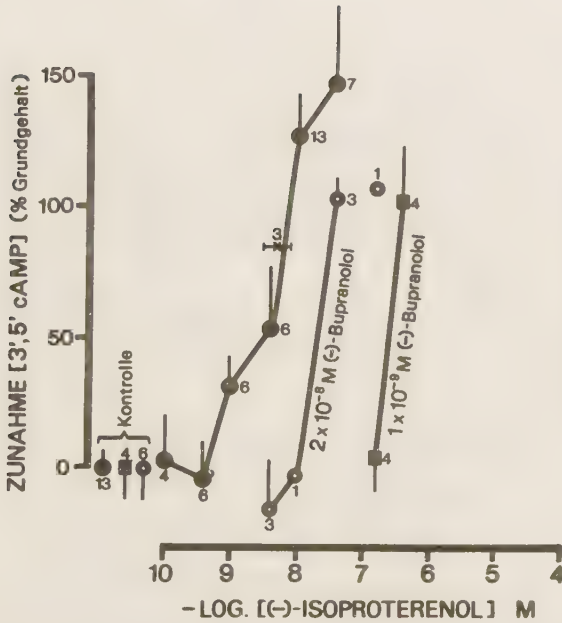


Abb. 32: Effekt von (-)-Isoproterenol auf die Änderung des cAMP-Gehalts von Rattenherzzellkulturen (1 Minute Inkubation) und Hemmung des Effekts durch (-)-Bupranolol (25 Minuten Präinkubation). Konzentrationsquotienten zwischen gleicheffektiven Konzentrationen (-)-Isoproterenol in Gegenwart und Abwesenheit von (-)-Bupranolol wurden abgeschätzt (vergleiche Tabelle XVII).

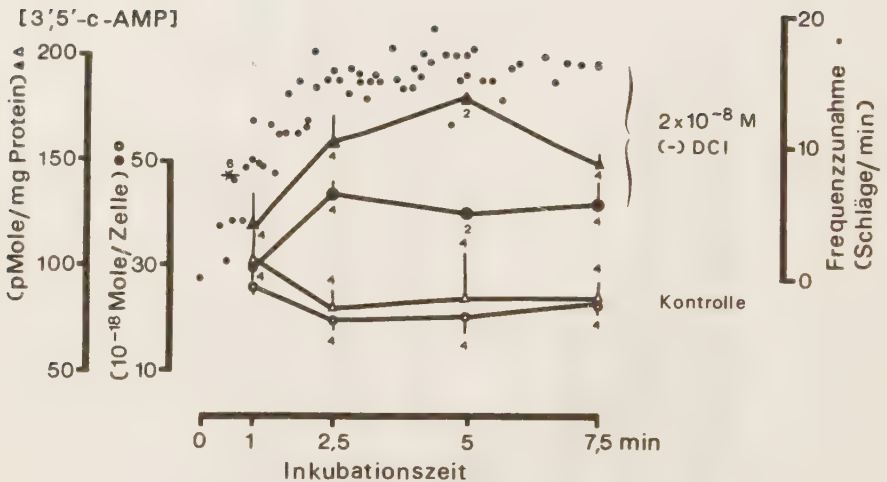


Abb. 33: Vergleich der Kinetik des positiv chronotropen Effekts von 2×10^{-8} M (-)-DCI (●) an spontanschlagenden kultivierten Rattenherzzellen mit der in Gegenwart von 1 mM MIX (15 Minuten Präinkubation) durch die gleiche Konzentration des partiellen Agonisten stimulierten Änderung des cAMP-Gehalts (●▲). Die offenen Symbole (○△) sind Kontrollwerte des cAMP-Gehalts nach Inkubation in $0.4 \mu\text{M}$ EDTA (15 Minuten Präinkubation in 1 mM MIX). Die Frequenzzunahmen (●) sind Mittelwerte aus 6 Einzelversuchen an Zellkulturen, die unter den gleichen Versuchsbedingungen gehalten wurden, wie die Kulturen, an denen der cAMP-Gehalt bestimmt wurde, allerdings ohne Präinkubation in MIX. Die $t_{1/2}$ der Frequenzzunahme (35.8 ± 8.9 sec $n=6$) ist eingezeichnet.

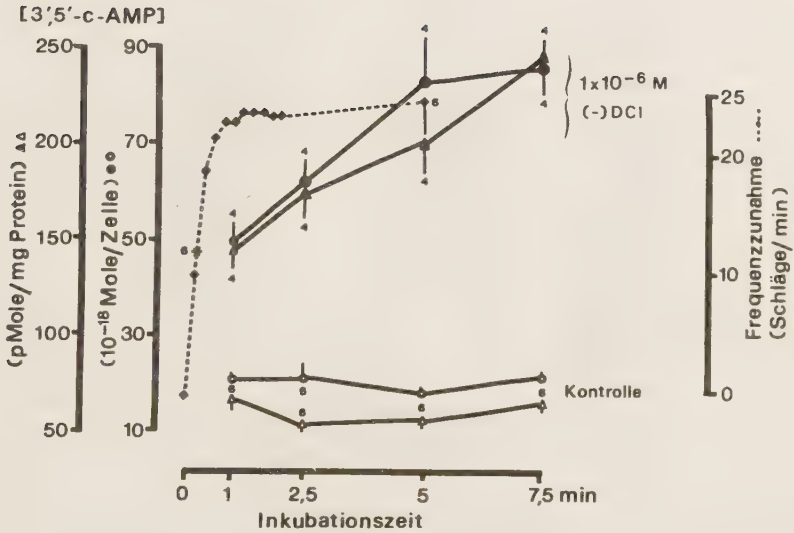


Abb. 34: Vergleich der Kinetik des positiv chronotropen Effekts von 1×10^{-6} M (-)-DCI (◆) mit der in Gegenwart von 1 mM MIX durch die gleiche Konzentration des partiellen Agonisten stimulierten Änderung des cAMP-Gehalts (●▲). Vergleiche Beschreibung Abb. 33. Die $t_{1/2}$ des positiv chronotropen Effekts (15.6 ± 3 sec $n=6$) ist eingezeichnet.

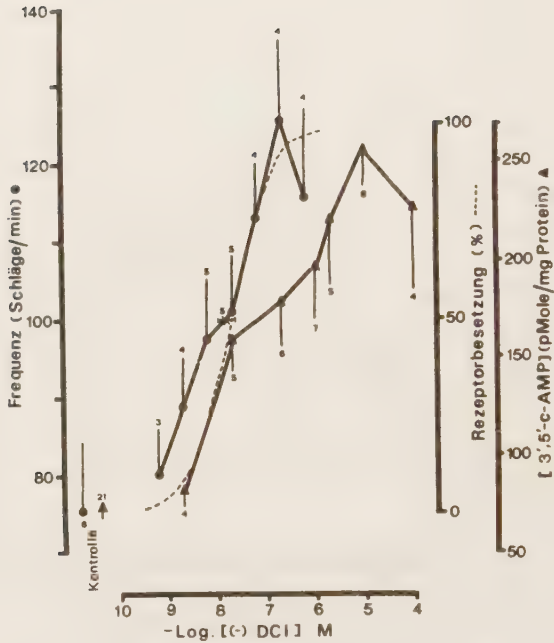


Abb. 35: Vergleich der Dosis-Wirkungskurve des durch (-)-DCI hervorgerufenen positiv chronotropen Effekts (●) mit der fraktionellen Rezeptorbesetzungskurve der β -Adrenoceptoren durch den partiellen Agonisten (---) und der Dosis-Abhängigkeit der durch 5 Minuten Inkubation in (-)-DCI in Gegenwart von MIX (15 Minuten Präinkubation in 1 mM MIX) induzierten Änderung des zellulären cAMP-Gehalts (▲). Versuch an kultivierten Rattenherzzellen. Erklärung siehe Text. Die Ziffern über den Symbolen geben die Zahl der Versuche, die senkrechten Linien die SEM an. Der maximale Effekt auf die Frequenz wurde willkürlich als Norm für 100% Rezeptorbesetzung gesetzt.

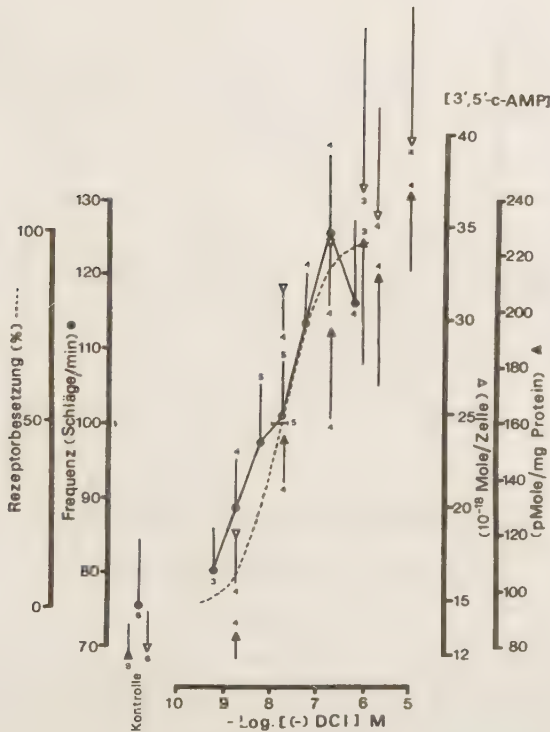


Abb. 36: Vergleich des positiv chronotropen Effekts von (-)-DCI (●) mit der fraktionellen Rezeptorbesetzungskurve der β -Adrenoceptoren (---) durch den partiellen Agonisten und der durch 5 Minuten Inkubation in (-)-DCI, in Gegenwart von 1 mM MIX (15 Minuten Präinkubation), induzierten Änderung des cAMP-Gehalts (▲ ▼). Versuch an kultivierten Rattenherzzellen. Erklärung siehe Text. Die Ziffern über den Symbolen geben die Zahl der Versuche, die senkrechten Linien die SEM an. Der maximale positiv chronotrope Effekt wurde willkürlich als Maß für 100% Rezeptorbesetzung gewählt.

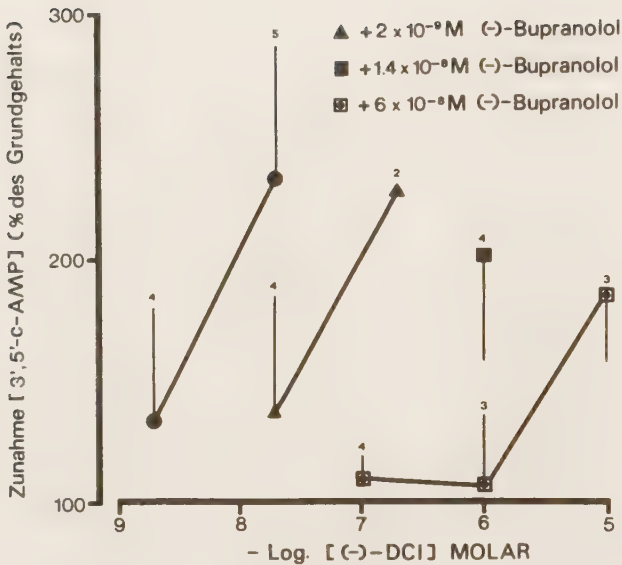


Abb. 37: Hemmung der durch 5 Minuten Inkubation in (-)-DCI (15 Minuten Präinkubation in 1 mM MIX) induzierten Änderung des cAMP-Gehalts durch Präinkubation der Zellen in (-)-Bupranolol. Die Änderung des cAMP-Gehalts wurde als prozentuale Zunahme, bezogen auf den Grundgehalt, aufgetragen, wobei der Grundgehalt der Kontrollkulturen 100% gesetzt ist. Die Ziffern über den Symbolen geben die Zahl der Versuche, die senkrechten Striche die SEM an. Konzentrationsquotienten zwischen gleichwirksamen Konzentrationen (-)-DCI in Gegenwart und Abwesenheit von (-)-Bupranolol wurden abgeschätzt. Vergleiche Abb. 38 und Tabelle XVII.

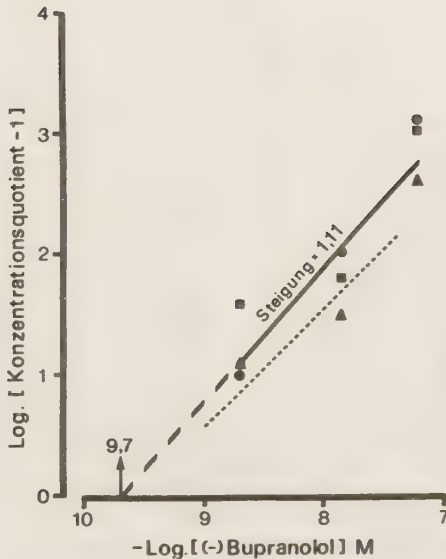


Abb. 38: Antagonismus zwischen (-)-DCI und (-)-Bupranolol, bestimmt anhand der durch den partiellen Agonisten induzierten Änderung des cAMP-Gehalts der kultivierten Rattenherzzellen. Doppel-log. Auftragung aller ermittelten Konzentrationsquotienten gleichwirksamer Konzentrationen (-)-DCI in Gegenwart und Abwesenheit des Hemmers gegen die entsprechende Konzentration (-)-Bupranolol. Drei verschiedene Auftragsweisen wurden bei der Berechnung der Konzentrationsquotienten verwendet: Zunahme des cAMP-Gehalts pro mg Protein (■), Zunahme des cAMP-Gehalts pro Zelle (▲), prozentuale Zunahme des cAMP-Gehalts (● vergleiche Abb. 40 und Erklärung). Die Werte der Konzentrationsquotienten sind in Tabelle XVII zusammengefaßt. Die gestrichelte Linie gibt einen Vergleich mit der Regression der doppel-log. Auftragung der Konzentrationsquotienten, die anhand der Hemmung des positiv chronotropen Effekts von (-)-DCI durch (-)-Bupranolol ermittelt wurden (Abb. 17).

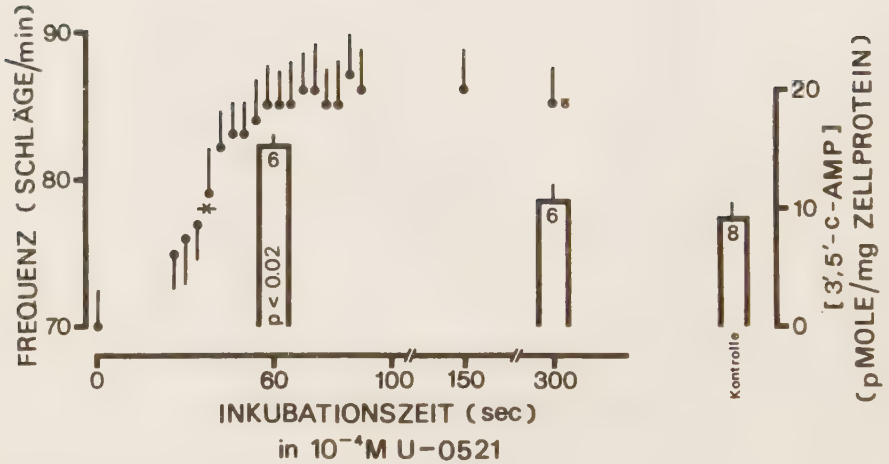


Abb. 39: Vergleich der Kinetik des positiv chronotropen Effekts von 1×10^{-4} M U-0521 (●) mit der Änderung des cAMP-Gehalts der kultivierten Rattenherzzellen nach 1 Minute und 5 Minuten Inkubation in die gleiche Konzentration des Propiophenons (Säulen). Die $t_{1/2}$ (37 ± 3.3 sec $n=6$) des positiv chronotropen Effekts ist eingetragen. p gibt die Signifikanz des Unterschieds des zellulären cAMP-Gehalts verglichen mit der Kontrolle an. Die Ziffern in den Säulen geben die Zahl der Versuche, die senkrechten Striche die SEM an.

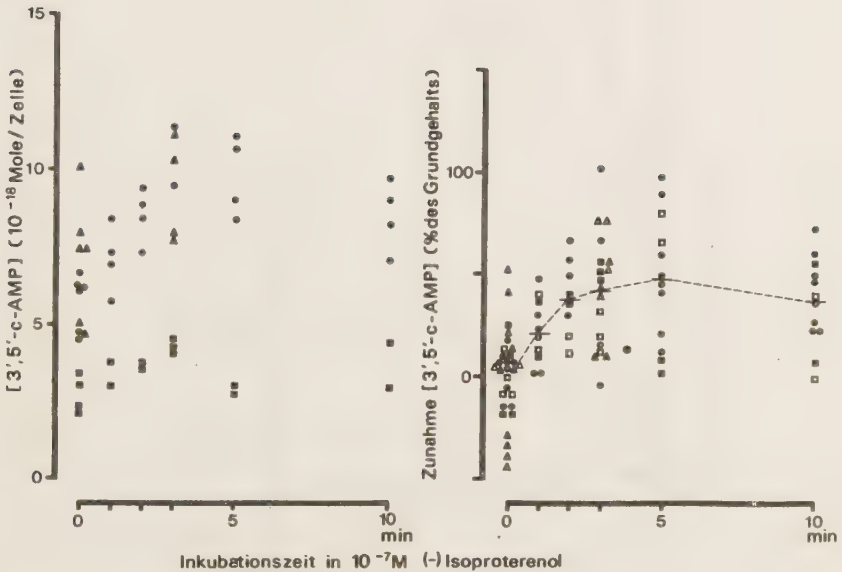


Abb. 40: Effekt von 1×10^{-7} M (-)-Isoproterenol auf den cAMP-Gehalt von Zellkulturen embryonaler Hühnerherzen. Der linke Bildteil stellt drei unabhängige Versuche dar (unterschiedliche Symbole), in welchen die Zeitabhängigkeit des Effekts von (-)-Isoproterenol auf den cAMP-Gehalt der Zellen untersucht wurde. Der rechte Bildteil stellt die Normierung der Werte durch Auftragung in % Zunahme ausgehend vom Mittelwert des Grundgehalts der entsprechenden Zellcharge dar. Die geschlossenen Symbole geben Werte an, die anhand der Änderung des cAMP-Gehalts pro Zelle, die offenen Symbole Werte, die anhand der Änderung des cAMP-Gehalts pro mg Protein ermittelt wurden. Die gestrichelten Linien verbinden die für die entsprechenden Versuchszeiten berechneten Mittelwerte der Versuchspunkte (--- bezogen auf Zellzahl, --- bezogen auf Zellprotein). (Vergleiche auch Abb. 41, 1×10^{-7} M Isoproterenol).

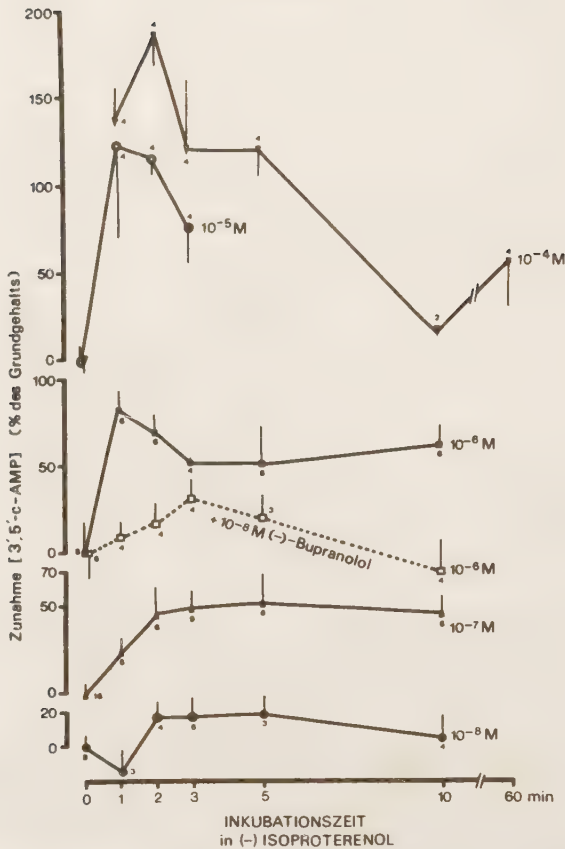


Abb. 41: Zeitabhängigkeit und Dosisabhängigkeit des Effekts von (-)-Isoproterenol auf den zellulären cAMP-Gehalt kultivierter embryonaler Hühnerherzzellen. Aufgetragen ist die prozentuale Änderung des cAMP-Gehalts pro Zelle ausgehend vom Mittelwert des Grundgehalts gegen die entsprechende Inkubationszeit (vergleiche Abb. 40). Die Ziffern über den Symbolen geben die Zahl der Versuche, die senkrechten Linien die SEM an. Die Zeitabhängigkeit des Effekts von 1×10^{-6} M (-)-Isoproterenol ist einmal in Gegenwart von 1×10^{-8} M (-)-Bupranolol (25 Minuten Präinkubation) und bei Abwesenheit des Hemmers dargestellt. Die SEM über den Kontrollfrequenzen ($t=0$) ergeben sich durch die Varianz der Kontrollwerte (vergleiche Abb. 40, rechte Bildhälfte).

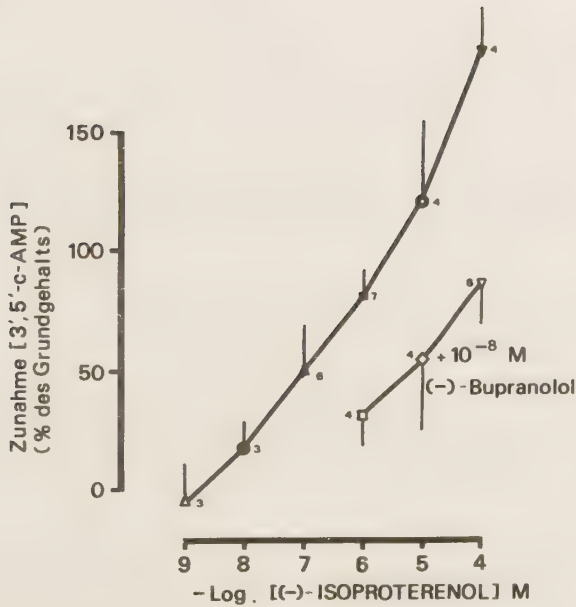


Abb. 42: Maximale Effekte von (-)-Isoproterenol auf den cAMP-Gehalt von Hühnerherzzellkulturen und Hemmung der Effekte durch 1×10^{-8} M (-)-Bupranolol (25 Minuten Präinkubation). Der Konzentrationsquotient zwischen gleich wirksamen Konzentrationen (-)-Isoproterenol in Gegenwart und Abwesenheit von (-)-Bupranolol beträgt im Mittel 60 (vergleiche Tabelle XVII).

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. J.G. Moser danke ich für die Vergabe des Themas, seine Unterstützung bei der Arbeit und für viele hilfreiche Ratschläge.

Für die finanzielle Unterstützung der Untersuchungen und den Ausbau der Zellkultur danke ich Herrn Prof. Dr. R. Kaufmann.

Herr Dr. A.J. Kaumann gab mir wesentliche Anleitungen und Ratschläge bei der Untersuchung der β -Rezeptoren.

Vor allem möchte ich Frl. Sonja Wörner danken, deren Mithilfe in den Zellkulturen und deren Einsatz bei der Durchführung und Auswertung der Versuche ein Arbeitsprogramm von diesem Ausmaß erst ermöglichte.

Für die Ausführung der Zeichnungen und die Reinschrift der Arbeit bin ich Frl. Sibille Holzmann zu großem Dank verpflichtet.

Die Arbeit wurde mit Mitteln der DFG im Rahmen des Schwerpunktprogramms Biochemie der Morphogenese (Prof. Moser) und des SFB 30 (Projekt D3) wesentlich unterstützt.

Die Firma Schwarz-Sanol Monheim stellte die Substanz Bupranolol zur Verfügung.

Teile dieser Arbeit wurden oder werden bereits publiziert.

KAUMANN, A.J., WITTMANN, R. (1975):

Apparent equilibrium constants between β -adrenoceptors and a competitive antagonist on a cultured pacemaker cell of mammalian heart.

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 287, 23-32

WITTMANN, R., KAUMANN, A.J. (1976):

Relationships between β -adrenoceptor occupancy, positive chronotropic effects and cAMP production by (-)-dichloroisoprenaline (DCI) in single beating cells of new-born rat hearts.

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 293, R23

KAUMANN, A.J., WITTMANN, R., BIRNBAUMER, L., HOPPE, B. (1977a): Activation of myocardial β -adrenoceptor by a nitrogen-free low affinity ligand, 3',4'-dihydroxy- β -methylpropiofenone (U-0521).

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 296, 217-228

KAUMANN, A.J. BIRNBAUMER, L., WITTMANN, R. (1977b):

Heart β -adrenoceptors.

Academic Press New York (eds. B.W. O'Malley and L. Birnbaumer) 1978.

LEBENS LAUF

Rainer Wittmann

Geburtsdatum: 17.1.1948

Geburtsort: Nürnberg

Staatsangehörigkeit: deutsch

Konfession: evangelisch

Eltern: Fritz Wittmann, geb. 29.12.1921

Beruf: Versicherungskaufmann

Rosa Wittmann, geb. Franz, geb. 30.11.1919

Grundschule: 1954-1957 Frankfurt/Main

1957-1958 Karlsruhe

Gymnasium: Neusprachlicher Zweig

1958-1966 Karlsruhe, Max-Planck-Gymnasium

1966-1967 Freiburg/Br., Kepler-Gymnasium

Schulabschluß: 1967 Abitur

Bundeswehr: 1967-1969, W 18, Fr.d.R.

Studium: 1969-1973 Freiburg/Br., Biologie

Studienabschluß: Diplom (Biologie) 1973

Verheiratet: 1972

Ehefrau Stephanie Wittmann, geb. Mischer, geb. 18.6.1945

1974-1977: wiss. Ang. Universität Düsseldorf, SFB 30,

Physiologisches Institut, Lehrstuhl für

Klinische Physiologie

Seit 1977: Studienreferendar für das Lehramt an Gymnasien

Bezirkseminar I Düsseldorf

Fotodruck Mainz, 5100 Aachen, Neupforte 13, Nähe Markt, Telefon (02 41) 2 73 05